

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 12 月 23 日 (23.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/111235 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, 1/21, 5/10, C07K 14/435,  
19/00, C12Q 1/02, G01N 33/50, 33/533理化学研究所内 Saitama (JP). 唐澤 智司 (KARASAWA,  
Satoshi) [JP/JP]; 〒3960002 長野県伊那市大字手良沢  
岡字大原 1063-103 株式会社医学生物学研  
究所 伊那研究所内 Nagano (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/008786

(22) 国際出願日: 2004 年 6 月 16 日 (16.06.2004)

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS &  
CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号  
京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-170324 2003 年 6 月 16 日 (16.06.2003) JP  
特願2003-170325 2003 年 6 月 16 日 (16.06.2003) JP  
特願2003-170326 2003 年 6 月 16 日 (16.06.2003) JP  
特願2003-170327 2003 年 6 月 16 日 (16.06.2003) JP  
特願2003-170328 2003 年 6 月 16 日 (16.06.2003) JP  
特願2003-170329 2003 年 6 月 16 日 (16.06.2003) JP(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行  
政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉  
県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 株式会社医学生  
物学研究所 (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORA-  
TORIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒4600002 愛知県名古屋  
市中区丸の内 3 丁目 5 番 10 号 住友商事丸の内ビ  
ル 5 F Aichi (JP).(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可  
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,  
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,  
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,  
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

(72) 発明者; および

添付公開書類:

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮脇 敦史  
(MIYAWAKI, Atsushi) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和  
光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内  
Saitama (JP). 筒井 秀和 (TSUTSUI, Hidekazu) [JP/JP];  
〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

WO 2004/111235 A1

(54) Title: FLUORESCENT PROTEIN AND PIGMENT PROTEIN

(56) 発明の名称: 蛍光蛋白質及び色素蛋白質

(57) Abstract: A novel fluorescent protein derived from *Montipora* sp., *Acropora* sp. and *Lobophytum crassum*; and a novel pigment protein derived from *Actinia equina*.(57) 要約: 本発明の目的は、新規な蛍光蛋白質及び色素蛋白質を提供することである。本発明によれば、コモン  
サンゴ (*Montipora* sp.)、ミドリイシ (*Acropora* sp.) 及びウミキノコ (*Lobophytum crassum*) 由来の新規な蛍光  
蛋白質、並びにウメボシソギンチャク (*Actinia equina*) 由来の新規な色素蛋白質が提供される。

Best Available Copy

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

## 明細書

## 蛍光蛋白質及び色素蛋白質

## 技術分野

本発明は、新規な蛍光蛋白質に関する。より詳細には、本発明は、コモンサンゴ (*Montipora* sp.)、ミドリイシ (*Acropora* sp.) 及びウミキノコ (*Lobophytum crassum*) 由来の新規な蛍光蛋白質及びその利用に関する。

さらに本発明は、新規な色素蛋白質に関する。より詳細には、本発明は、ウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) 由来の新規な色素蛋白質及びその利用に関する。

## 背景技術

クラゲのエクオレア・ビクトリア (*Aequorea victoria*) に由来する緑色蛍光蛋白質 (GFP) は、生物系において多くの用途を有する。最近、ランダム突然変異誘発法および半合理的 (semi-rational) 突然変異誘発法に基づいて、色を変化させたり、折りたたみ特性を改善したり、輝度を高めたり、あるいは pH 感受性を改変したといった様々な GFP 変異体が作製されている。遺伝子組み換え技術により他の蛋白質を GFP 等の蛍光蛋白質に融合させて、それらの発現および輸送のモニタリングを行うことが行われている。

最もよく使用される GFP 変異体の一つとして黄色蛍光蛋白質 (YFP) が挙げられる。YFP は、クラゲ (*Aequorea*) GFP 変異体の中でも最長波長の蛍光を示す。大部分の YFP の  $\epsilon$  および  $\Phi$  は、それぞれ  $60,000 \sim 100,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  および  $0.6 \sim 0.8$  であり (Tsien, R. Y. (1998). *Ann. Rev. Biochem.* 67, 509-544)、これらの値は、一般的な蛍光団 (フルオレセインおよびローダミンなど) の値に匹敵する。従って YFP の絶対的輝度の改善は、ほぼ限界に達しつつある。

また、GFP 変異体の他の例として、シアン蛍光蛋白質 (CFP) があり、E CFP (enhanced cyan fluorescent protein) が知られている。また、イソギン

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

チャク (*Discoma* sp.) からは赤色蛍光蛋白質 (RFP) も単離されており、DasRed が知られている。このように蛍光蛋白質は、緑色、黄色、シアン色、赤色の4種が次々と開発されスペクトルの範囲は大幅に広がっている。

また、刺胞動物には、蛍光を発するものが存在する。刺胞動物由来の蛍光蛋白質遺伝子のクローニングが試みられているが、蛍光および生化学的な特性のレパートリーを増やすためには、より多くの遺伝子のクローニングが必要である。

一方、従来の蛍光蛋白質の量子収率を0に近づけたものが色素蛋白質である。色素蛋白質は、光エネルギーを他のエネルギーに変換する分子を細胞内に導入することができる点で様々な応用が可能である。しかしながら、色素蛋白質の吸収波長特性について報告されている例は少ない。

#### 発明の開示

本発明は、コモンサンゴ (*Montipora* sp.)、ミドリイシ (*Acropora* sp.)、及び及びウミキノコ (*Lobophytum crassum*) に由来する、新規な蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

さらに本発明は、従来のRFP (DsRed、クロンテック社) の示す幅広い励起スペクトルに比べ、よりシャープなスペクトルを有する蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

さらに本発明は、ウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) に由来する、ある特定の波長の光を吸収する新規な色素蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

上記課題を解決するために本発明者らは鋭意検討し、既知の蛍光蛋白質のアミノ酸配列の情報に基づいて好適なプライマーを設計し、コモンサンゴ (*Montipora* sp.)、ミドリイシ (*Acropora* sp.) 及びウミキノコ (*Lobophytum crassum*) 由来のcDNAライブラリーから上記プライマーを用いて新規な蛍光蛋白質をコードする遺伝子を増幅してクローニングすることに成功した。さらに本発明者らは、得られたコモンサンゴ (*Montipora* sp.)、ミドリイシ (*Acropora* sp.)、及びウミ

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

キノコ (*Lobophytum crassum*) 由来の蛍光蛋白質の蛍光特性及びpH感受性を解析した。また本発明者らは、既知の蛍光蛋白質のアミノ酸配列の情報に基づいて好適なプライマーを設計し、赤色を呈するウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) のcDNAライブラリーから上記プライマーを用いて新規な色素蛋白質をコードする遺伝子を増幅してクローニングすることに成功した。さらに本発明者らは、得られたウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) 由来の色素蛋白質の光吸収特性及びpH感受性を解析した。本発明は、これらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、以下の(1)～(35)に記載の発明が提供される。

(1) コモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 励起極大波長が507nmである；
- (2) 蛍光極大波長が517nmである；
- (3) 507nmにおけるモル吸光係数が104050である；
- (4) 量子収率が0.29である；
- (5) 光吸収特性のpH感受性がpKa=約5.5である；

(2) ミドリイシ (*Acropora* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 励起極大波長が505nmである；
- (2) 蛍光極大波長が516nmである；
- (3) 505nmにおけるモル吸光係数が53600である；
- (4) 量子収率が0.67である；
- (5) 光吸収特性のpH感受性がpKa=約6.4である；

(3) ミドリイシ (*Acropora* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 励起極大波長が472nmである；
- (2) 蛍光極大波長が496nmである；
- (3) 472nmにおけるモル吸光係数が27250である；
- (4) 量子収率が0.90である；
- (5) 光吸収特性のpH感受性がpKa=約6.6である；



WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

(4) コモンサンゴ (*Montipora sp.*) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 励起極大波長が 557 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 574 nm である；
- (3) 557 nm におけるモル吸光係数が 41750 である；
- (4) 量子収率が 0.41 である；
- (5) 光吸収特性の pH 感受性が  $pK_a < \text{約} 4.0$  である；

(5) ウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) 由来の下記の特性を有する色素蛋白質。

- (1) 吸収極大波長が 592 nm である；
- (2) 592 nm におけるモル吸光係数が 87000 である；
- (3) 光吸収特性の pH 感受性が pH 5～10 で安定である；

(6) ウミキノコ (*Lobophytum crassum*) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 励起極大波長が 482 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 498 nm である；
- (3) 482 nm におけるモル吸光係数が 71000 である；
- (4) 量子収率が 0.41 である；
- (5) 蛍光極大の pH 感受性が pH = 4～10 で安定である；

(7) 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；又は、

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光を有するアミノ酸配列；

(8) 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

(a) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列；又は、

(b) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光を有するアミノ酸配列；

(9) 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

(a) 配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列；又は、  
(b) 配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光を有するアミノ酸配列：

(10) 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

(a) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列；又は、  
(b) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光を有するアミノ酸配列：

(11) 以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質。

(a) 配列番号 11 に記載のアミノ酸配列；又は、  
(b) 配列番号 11 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列：

(12) 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

(a) 配列番号 13 に記載のアミノ酸配列；又は、  
(b) 配列番号 13 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光を有するアミノ酸配列：

(13) 請求項 1 から 12 の何れかに記載の蛋白質をコードする DNA。

(14) 以下の何れかの DNA。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、  
(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光蛋白質をコードする DNA：

(15) 以下の何れかの塩基配列を有する DNA。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列；又は、  
(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、蛍光蛋白質をコードする塩基配列：

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

(16) 以下の何れかのDNA。

- (a) 配列番号3に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、
- (b) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光蛋白質をコードするDNA：

(17) 以下の何れかの塩基配列を有するDNA。

- (a) 配列番号4に記載の塩基配列；又は、
- (b) 配列番号4に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、蛍光蛋白質をコードする塩基配列：

(18) 以下の何れかのDNA。

- (a) 配列番号5又は7に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、
- (b) 配列番号5又は7に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光蛋白質をコードするDNA：

(19) 以下の何れかの塩基配列を有するDNA。

- (a) 配列番号6又は8に記載の塩基配列；又は、
- (b) 配列番号6又は8に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、蛍光蛋白質をコードする塩基配列：

(20) 以下の何れかのDNA。

- (a) 配列番号9に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、
- (b) 配列番号9に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光蛋白質をコードするDNA：

(21) 以下の何れかの塩基配列を有するDNA。

- (a) 配列番号10に記載の塩基配列；又は、
- (b) 配列番号10に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、蛍光蛋白質をコードする塩基配列：

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

(22) 以下の何れかのDNA。

- (a) 配列番号11に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、
- (b) 配列番号11に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードするDNA：

(23) 以下の何れかの塩基配列を有するDNA。

- (a) 配列番号12に記載の塩基配列；又は、
- (b) 配列番号12に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

(24) 以下の何れかのDNA。

- (a) 配列番号13に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、
- (b) 配列番号13に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光蛋白質をコードするDNA：

(25) 以下の何れかの塩基配列を有するDNA。

- (a) 配列番号14に記載の塩基配列；又は、
- (b) 配列番号14に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、蛍光蛋白質をコードする塩基配列：

(26) (13) から (25) の何れかに記載のDNAを有する組み換えベクター。

(27) (13) から (25) の何れかに記載のDNA又は (26) に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

(28) (1) から (4)、(6)、(7) から (10) 又は (12) の何れかに記載の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛍光蛋白質。

(29) 他の蛋白質が細胞内に局在する蛋白質である、(28) に記載の融合蛍光蛋白質。

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

(30) 他の蛋白質が細胞内小器官に特異的な蛋白質である、(28)又は(29)に記載の融合蛍光蛋白質。

(31) (5)又は(11)に記載の色素蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛋白質。

(32) (28)から(30)の何れかに記載の融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法。

(33) (5)又は(11)に記載の色素蛋白質をアクセプター蛋白質として用いてFRET(蛍光共鳴エネルギー転移)法を行うことを特徴とする、生理活性物質の分析方法。

(34) (1)から(4)、(6)、(7)から(10)又は(12)の何れかに記載の蛍光蛋白質、(14)から(21)、(24)又は(25)の何れかに記載のDNA、(26)に記載の組み換えベクター、(27)に記載の形質転換体、又は(28)から(30)の何れかに記載の融合蛍光蛋白質を含む、蛍光試薬キット。

(35) (5)又は(11)に記載の色素蛋白質、(22)又は(23)に記載のDNA、(26)に記載の組み換えベクター、(27)に記載の形質転換体、又は(31)に記載の融合蛋白質を含む、吸光試薬キット。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明のコモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の蛍光蛋白質 (COG) の蛍光スペクトル及び励起スペクトル (図A)、蛍光蛋白質 (COG) の吸収スペクトル (図B)、及び蛍光蛋白質 (COG) の pH 感受性 (図C) を示す。図Cにおいて横軸は pH 値を示し、縦軸は吸光度を示す。

図2は、本発明のコモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の蛍光蛋白質 (COG) の pH5 での蛍光スペクトル及び励起スペクトル (図A) 及び pH5 での吸収スペクトル (図B) を示す。

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

図3は、本発明のミドリイシ (*Acropora* sp.) 由来の蛍光蛋白質 (MIG) の蛍光スペクトル及び励起スペクトル (図A)、蛍光蛋白質 (MIG) の吸収スペクトル (図B)、及び蛍光蛋白質 (MIG) の pH 感受性 (図C) を示す。図Cにおいて、横軸は pH 値を示し、縦軸は吸光度を示す。

図4は、本発明のミドリイシ (*Acropora* sp.) 由来の蛍光蛋白質 (MICy) の蛍光スペクトル及び励起スペクトル (図A)、蛍光蛋白質 (MICy) の吸収スペクトル (図B)、及び蛍光蛋白質 (MICy) の pH 感受性 (図C) を示す。図Cにおいて、横軸は pH 値を示し、縦軸は吸光度を示す。

図5は、本発明の蛍光蛋白質 (MiCy2) の pH 感受性 (図A) 及び励起・蛍光スペクトル (図B) を示す。

図6は、本発明のコモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の蛍光蛋白質 (COR) の蛍光スペクトル及び励起スペクトル (図A)、蛍光蛋白質 (COR) の吸収スペクトル (図B)、及び蛍光蛋白質 (COR) の pH 感受性 (図C) を示す。図Cにおいて、横軸は pH 値を示し、縦軸は吸光度を示す。

図7は、本発明のウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) 由来の色素蛋白質 (Ume) の吸収スペクトル (pH 7.9) を測定した結果 (図A)、及び色素蛋白質 (Ume) の吸収極大の pH 感受性 (図B) を示す。図Aにおいて、横軸は吸収光の波長を示し、縦軸は吸光度を示す。図Bにおいて、横軸は pH 値を示し、縦軸は吸光度を示す。

図8は、本発明のウミキノコ (*Lobophytum crassum*) 由来の蛍光蛋白質 (KnG) の蛍光スペクトル及び励起スペクトル (図A) 及び蛍光蛋白質 (KnG) の pH 依存性 (図B) を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

#### (1) 本発明の蛍光蛋白質及び色素蛋白質

本発明の第一の蛍光蛋白質は、コモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来のものである。

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

り、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 励起極大波長が 507 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 517 nm である；
- (3) 507 nm におけるモル吸光係数が 104050 である；
- (4) 量子収率が 0.29 である；
- (5) 光吸収特性の pH 感受性が  $pK_a = \text{約} 5.5$  である；

コモンスンゴ (Montipora sp.) は、刺胞動物門花虫綱六放サンゴ亜綱イシサンゴ目ミドリイシ科に属するサンゴの 1 種であり、塊状や被覆状の群体を形成することが多い。

本発明の第一の蛍光蛋白質は、以下の実施例で示す通り、励起極大波長が 507 nm であり、蛍光極大波長が 517 nm である。また、507 nm におけるモル吸光係数は 104050 であり、量子収率は 0.29 である。モル吸光係数は蛍光分子 1 モルあたりの光子の吸収量を表し、量子収率は吸収した光子のどれだけを蛍光として発することができるかを表した数値である。

本発明の第一の蛍光蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列；

本発明の第二の蛍光蛋白質は、ミドリイシ (Acropora sp.) 由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 励起極大波長が 505 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 516 nm である；
- (3) 505 nm におけるモル吸光係数が 53600 である；
- (4) 量子収率が 0.67 である；
- (5) 光吸収特性の pH 感受性が  $pK_a = \text{約} 6.4$  である；

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

ミドリイシ (*Acropora* sp.) は、刺胞動物門花虫綱六放サンゴ亜綱イシサンゴ目ミドリイシ科に属するサンゴの1種であり、枝状・テーブル状の群体を形成することが多い。

本発明の第二の蛍光蛋白質は、以下の実施例で示す通り、励起極大波長が505 nmであり、蛍光極大波長が516 nmである。また、505 nmにおけるモル吸光係数は53600であり、量子収率は0.67である。モル吸光係数は蛍光分子1モルあたりの光子の吸収量を表し、量子収率は吸収した光子のどれだけを蛍光として発することができるかを表した数値である。

本発明の第二の蛍光蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。

- (a) 配列番号3に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列；

本発明の第三の蛍光蛋白質は、ミドリイシ (*Acropora* sp.) 由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 励起極大波長が472 nmである；
- (2) 蛍光極大波長が496 nmである；
- (3) 472 nmにおけるモル吸光係数が27250である；
- (4) 量子収率が0.90である；
- (5) 光吸収特性のpH感受性がpKa=約6.6である；

本発明の第三の蛍光蛋白質は、以下の実施例で示す通り、励起極大波長が472 nmであり、蛍光極大波長が496 nmである。また、472 nmにおけるモル吸光係数は27250であり、量子収率は0.90である。モル吸光係数は蛍光分子1モルあたりの光子の吸収量を表し、量子収率は吸収した光子のどれだけを蛍光として発することができるかを表した数値である。

本発明の第三の蛍光蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を



WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

有する蛍光蛋白質が挙げられる。

(a) 配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列；又は、

(b) 配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列：

本発明の第四の蛍光蛋白質は、コモンサンゴ (*Montipora sp.*) 由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 励起極大波長が 557 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 574 nm である；
- (3) 557 nm におけるモル吸光係数が 41750 である；
- (4) 量子収率が 0.41 である；
- (5) 光吸収特性の pH 感受性が  $pK_a < 約 4.0$  である；

本発明の第四の蛍光蛋白質は、以下の実施例で示す通り、励起極大波長が 557 nm であり、蛍光極大波長が 574 nm である。また、557 nm におけるモル吸光係数は 41750 であり、量子収率は 0.41 である。モル吸光係数は蛍光分子 1 モルあたりの光子の吸収量を表し、量子収率は吸収した光子のどれだけを蛍光として発することができるかを表した数値である。

本発明の第四の蛍光蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。

(a) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列；又は、

(b) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列：

本発明の色素蛋白質は、ウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) 由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 吸収極大波長が 592 nm である；
- (2) 592 nm におけるモル吸光係数が 87000 である；

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

(3) 光吸収特性のpH感受性がpH5~10で安定である：

ウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) は、刺胞動物門 (Cnidaria) の刺胞動物亜門の花虫綱 (サンゴ虫類) (Anthozoa) の六放珊瑚亜綱 (Hexacorallia) の磯巾着目 (Actiniaria) のウメボシイソギンチャク科 (Actiniidae) に属するイソギンチャクの1種である。ウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) は、日本では九州以北の磯に普通に見られ、触手を上げると水中で赤い花が咲いているように見える。

なお、本書中以下の実施例では、ウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) を出発材料として上記特性を有する色素蛋白質を単離したが、ウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) 以外のイソギンチャクから本発明の色素蛋白質を取得することができる場合もあり、そのような色素蛋白質も本発明の範囲内である。

本発明の色素蛋白質は、以下の実施例で示す通り、吸収極大波長が592nmであり、また、592nmにおけるモル吸光係数は87000である。

モル吸光係数は蛍光分子1モルあたりの光子の吸収量を表す。量子収率は吸収した光子のどれだけを蛍光として発することができるかを表した数値である。本発明の色素蛋白質の量子収率は極めて低いため、蛍光は殆ど発しない。この性質から、本発明の色素蛋白質は、(1) FRETのアクセプター分子 (エネルギー受容体) として用いたり、(2) 照射した光のエネルギーを光以外のエネルギーに変換させるシステムの開発に利用したり、あるいは(3) 蛋白質のアミノ酸配列に変異を導入して蛍光を発するように改変することなどに用いることができる。

また、本発明の色素蛋白質は、光吸収特性のpH感受性がpH5~10で安定であることを特徴とする。即ち、本発明の色素蛋白質では、pH5~10の範囲において吸収スペクトルのピーク値の変動が少ない。従って、本発明の色素蛋白質は、広範囲のpH環境において同様の条件で使用することができ、生体内での使用に際しての制約は少ない。

本発明の色素蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質が挙げられる。

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

- (a) 配列番号 11 に記載のアミノ酸配列；又は、  
(b) 配列番号 11 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列：

本発明の第五の蛍光蛋白質は、ウミキノコ (*Lobophytum crassum*) 由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 励起極大波長が 482 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 498 nm である；
- (3) 482 nm におけるモル吸光係数が 71000 である；
- (4) 量子収率が 0.41 である；
- (5) 蛍光極大の pH 感受性が pH = 4 ~ 10 で安定である：

ウミキノコ (*Lobophytum crassum*) は、刺胞動物門花虫綱八放サンゴ亜綱に属するサンゴの 1 種である。

本発明の第五の蛍光蛋白質は、以下の実施例で示す通り、励起極大波長が 482 nm であり、蛍光極大波長が 498 nm である。また、482 nm におけるモル吸光係数は 71000 であり、量子収率は 0.41 である。モル吸光係数は蛍光分子 1 モルあたりの光子の吸収量を表し、量子収率は吸収した光子のどれだけを蛍光として発することができるかを表した数値である。

本発明の第五の蛍光蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。

- (a) 配列番号 13 に記載のアミノ酸配列；又は、  
(b) 配列番号 13 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列：

本明細書で言う「1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「1 から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1 から 20 個、好ましくは 1 から 10 個、より好ましくは 1 から 7 個、さらに好

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

本明細書で言う「蛍光を有する」および「蛍光蛋白質」とは、蛍光を発することができる全ての場合を包含し、蛍光強度、励起波長、蛍光波長、pH感受性などの諸特性は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と比較して、変動していてもよいし、同様のままでもよい。

本明細書で言う「吸光特性」とは、ある波長の光を吸収できる特性を意味し、例えば、本明細書に示した色素蛋白質と同様に吸収極大波長が592nmであってもよいし、あるいは吸収極大波長の値がシフトしたものであってもよい。なお、光吸収特性のpH感受性は、pH5～10で安定であることが好ましい。

上記した通り、本発明の配列表の配列番号11に記載したアミノ酸配列を有する色素蛋白質は蛍光をほとんど発しないものである。本発明においては、配列番号11に記載したアミノ酸配列に対して1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を導入することにより、より強い蛍光を発する蛋白質を作製してもよく、このような蛋白質も本発明の範囲内に含まれる。

本発明の蛍光蛋白質及び色素蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1、3、5、7、9、11又は13に記載したアミノ酸配列並びに配列番号2、4、6、8、10、12又は14に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いてコモンサンゴ(*Montipora* sp.)、ミドリイシ(*Acropora* sp.)、ウメボシイソギンチャク(*Actinia equina*)、又はウミキノコ(*Lobophytum crassum*)由来のcDNAライブラリーを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛍光蛋白質又は色素蛋白質をコードするDNAを取得することができる。本発明の蛍光蛋白質又は色素蛋白質をコードするDNAの一部の断片を上記したPCRにより得た場合には、作製したDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

することにより、所望の蛍光蛋白質又は色素蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の蛍光蛋白質又は色素蛋白質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

## (2) 本発明のDNA

本発明によれば、本発明の蛍光蛋白質又は色素蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAの具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

(a) 配列番号1、3、5、7、9又は13に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、

(b) 配列番号1、3、5、7、9又は13に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA。

本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAのさらなる具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

(a) 配列番号2、4、6、8、10又は14に記載の塩基配列を有するDNA；又は、

(b) 配列番号2、4、6、8、10又は14に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA；

本発明の色素蛋白質をコードするDNAの具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

(a) 配列番号11に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、

(b) 配列番号11に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコ

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

ードするDNA:

本発明の色素蛋白質をコードするDNAの更なる具体例としては、以下の何れかの塩基配列を有するDNAが挙げられる。

- (a) 配列番号12に記載の塩基配列;又は、
- (b) 配列番号12に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び/又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列:

本発明のDNAは、例えばホスホアミダイト法などにより合成することができるし、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって製造することもできる。本発明のDNA又はその断片の作製方法については、本明細書中上述した通りである。

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるPCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するDNAを構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989、並びに Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)に記載されている。

### (3) 本発明の組み換えベクター

本発明のDNAは適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター(例えばプラスミド等)でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターに

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

において本発明のDNAは、転写に必要な要素（例えば、プロモーター等）が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜することができる。

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子 (*Bacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene*)、バチルス・リケニホルミス  $\alpha$  アミラーゼ遺伝子 (*Bacillus licheniformis alpha-amylase gene*)、バチルス・アミロリケファチエンス・BAN アミラーゼ遺伝子 (*Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene*)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子 (*Bacillus Subtilis alkaline protease gene*) もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子 (*Bacillus pumilus xylosidase gene*) のプロモータ、またはファージ・ラムダの  $P_R$  若しくは  $P_L$  プロモータ、大腸菌の *lac*、*trp* 若しくは *tac* プロモータなどが挙げられる。

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40プロモータ、MT-1（メタロチオネイン遺伝子）プロモータ、またはアデノウイルス2主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10プロモータ、オートグラフィア・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュウロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TPI1プロモータ、ADH2-4cプロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3プロモータまたは *tpiA* プロモータなどがある。

また、本発明のDNAは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主についてはTPI1ターミネータ若しくはADH3ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベ

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

クターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばSV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えばSV40エンハンサ)および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルスVA RNAをコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはSV40複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカ含有してもよい。選択マーカとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)またはシノサッカロマイセス・ポンベTPI遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明のDNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび/または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

#### (4) 本発明の形質転換体

本発明のDNA又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明のDNAまたは組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明のDNA構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行なえばよい。



WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

哺乳類細胞の例としては、HEK 293細胞、HeLa細胞、COS細胞、BHK細胞、CHL細胞またはCHO細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはサッカロマイセス・クルイペリ (*Saccharomyces kluyveri*) 等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスポラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる (例えば、*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*; 及び *カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Bio/Technology*, 6, 47 (1988) 等に記載)。

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞である Sf 9、Sf 21 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞である *Hi Five* (インビトロジェン社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の蛍光融合蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

#### (5) 本発明の蛍光蛋白質及びそれを含む融合蛍光蛋白質の利用

本発明は蛍光蛋白質を他の蛋白質と融合させることにより、融合蛍光蛋白質を構築することができる。

本発明の融合蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1、3、5又は7、9又は13に記載したアミノ酸配列及び配列番号2、4、6又は8、10又は14に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、本発明の蛍光蛋白質の遺伝子を含むDNA断片を鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAを構築するのに必要なDNA断片を作製することができる。また同様に、融合すべき蛋白質をコードするDNA断片も入手する。

次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛍光蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛍光蛋白質を産生することができる。

本発明の蛍光蛋白質は、特に、標識としての利用価値が高い。即ち、本発明の蛍光蛋白質を被検アミノ酸配列との融合蛋白質として精製し、マイクロインジェクション法などの手法により細胞内に導入し、該融合蛋白質の分布を経時的に観察すれば、被検アミノ酸配列の細胞内におけるターゲッティング活性を検出することが可能である。

本発明の蛍光蛋白質を融合させる他の蛋白質（被検アミノ酸配列）の種類は特に限定されるものではないが、例えば、細胞内に局在する蛋白質、細胞内小器官に特異的な蛋白質、ターゲティングシグナル（例えば、核移行シグナル、ミトコンドリアプレ配列）等が好適である。なお、本発明の蛍光蛋白質は、マイクロインジェクション法などにより細胞内に導入する以外に、細胞内で発現させて用いることも可能である。この場合には、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが発現可能に挿入されたベクターが宿主細胞に導入される。

また、本発明の蛍光蛋白質は、レポーター蛋白質としてプロモーター活性の測定に用いることも可能である。即ち、被検プロモーターの下流に、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが配置されたベクターを構築し、これを宿主細胞に導

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

入し、該細胞から発せられる本発明の蛍光蛋白質の蛍光を検出することにより、被検プロモーターの活性を測定することが可能である。被検プロモーターとしては、宿主細胞内で機能するものであれば、特に制限はない。

上記被検アミノ酸配列のターゲティング活性の検出やプロモーター活性の測定において用いられるベクターとしては、特に制限はないが、例えば、動物細胞用ベクターでは、「pNEO」(P. Southern, and P. Berg (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:327)、 「pCAGGS」 (H. Niwa, K. Yamamura, and J. Miyazaki. Gene 108, 193-200 (1991))、「pRc/CMV」(インビトロゲン社製)、「pCDM8」(インビトロゲン社製)などが、酵母用ベクターでは、「pRS303」、「pRS304」、「pRS305」、「pRS306」、「pRS313」、「pRS314」、「pRS315」、「pRS316」(R. S. Sikorski and P. Hieter (1989) Genetics 122: 19-27)、「pRS423」、「pRS424」、「pRS425」、「pRS426」(T. W. Christianson, R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero, and P. Hieter (1992) Gene 110: 119-122)などが好適に用いられる。

また、使用可能な細胞の種類も特に限定されず、各種の動物細胞、例えば、L細胞、BalbC-3T3細胞、NIH3T3細胞、CHO (Chinese hamster ovary)細胞、HeLa細胞、NRK (normal rat kidney)細胞、「Saccharomyces cerevisiae」などの酵母細胞や大腸菌 (E. coli) 細胞などを使用することができる。ベクターの宿主細胞への導入は、例えば、リン酸カルシウム法やエレクトロポレーション法などの常法により行うことができる。

上記のようにして得た、本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質 (蛋白質Xとする) とを融合させた融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させ、発する蛍光をモニターすることにより、細胞内における蛋白質Xの局在や動態を分析することが可能になる。即ち、本発明の融合蛍光蛋白質をコードするDNAで形質転換またはトランスフェクトした細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより細胞内における蛋白質Xの局在や動態を可視化して分析することができる。

例えば、蛋白質Xとして細胞内オルガネラに特異的な蛋白質を利用することにより、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、分泌小胞、ペルオキシソームなど

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

の分布や動きを観察できる。

また、例えば、神経細胞の軸索、樹状突起などは発生途中の個体の中で著しく複雑な走向の変化を示すので、こういった部位を蛍光ラベルすることにより動的解析が可能になる。

本発明の蛍光蛋白質の蛍光は、生細胞のまま検出することが可能である。この検出は、例えば、蛍光顕微鏡（カールツァイス社 アキシオフォト フィルターセット 09）や画像解析装置（ATTO デジタルイメージアナライザー）などを用いて行うことが可能である。

顕微鏡の種類は目的に応じて適宜選択できる。経時変化を追跡するなど頻回の観察を必要とする場合には、通常の落射型蛍光顕微鏡が好ましい。細胞内の詳細な局在を追及したい場合など、解像度を重視する場合は、共焦点レーザー顕微鏡の方が好ましい。顕微鏡システムとしては、細胞の生理状態を保ち、コンタミネーションを防止する観点から、倒立型顕微鏡が好ましい。正立顕微鏡を使用する場合、高倍率レンズを用いる際には水浸レンズを用いることができる。

フィルターセットは蛍光蛋白質の蛍光波長に応じて適切なものを選択できる。本発明の第一及び第二の蛍光蛋白質の場合、励起光490～510nm、蛍光510～530nm程度のフィルターを使用することが好ましい。本発明の第三の蛍光蛋白質の場合、励起光460～480nm、蛍光480～510nm程度のフィルターを使用することが好ましい。本発明の第四の蛍光蛋白質の場合、励起光550～565nm、蛍光570～580nm程度のフィルターを使用することが好ましい。本発明の第五の蛍光蛋白質の場合、励起光470～490nm、蛍光490～510nm程度のフィルターを使用することが好ましい。

また、蛍光顕微鏡を用いた生細胞での経時観察を行う場合には、短時間で撮影を行うべきなので、高感度冷却CCDカメラを使用する。冷却CCDカメラは、CCDを冷却することにより熱雑音を下げ、微弱な蛍光像を短時間露光で鮮明に撮影することができる。

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

#### (6) 本発明の色素蛋白質及びそれを含む融合蛋白質の利用

本発明の色素蛋白質は、他の蛋白質と融合させることにより、融合蛋白質を構築することができる。本発明の色素蛋白質に融合させる他の蛋白質の種類は特に限定されないが、他の分子と相互作用する蛋白質であることが好ましく、例えば、受容体蛋白質又はそのリガンド、あるいは抗原又は抗体などが挙げられる。

本発明の融合蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え融合蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本発明の色素蛋白質をコードするDNAおよびそれに融合すべき他の蛋白質をコードするDNAは、本明細書中上記した方法またはそれに準じてそれぞれ入手することができる。次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛋白質を産生することができる。

分子間の相互作用を分析する手法の一つとして、FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）が知られている。FRETでは、例えば、第一の蛍光蛋白質としてのシアン蛍光蛋白質（CFP）で標識した第一の分子と、第二の蛍光蛋白質としての黄色蛍光蛋白質（YFP）で標識した第二の分子とを共存させることにより、黄色蛍光蛋白質（YFP）をアクセプター分子として作用させ、シアン蛍光蛋白質（CFP）をドナー分子として作用させ、両者の間でFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）を生じさせることにより、第一の分子と第二の分子との間の相互作用を可視化することができる。即ち、FRETでは2種類の分子にそれぞれ異なる色素を導入し、エネルギーレベルの高い方の色素（ドナー分子）を選択的に励起し、その色素の蛍光を測定し、もう一方の色素（アクセプター分子）からの長波長蛍光も測定して、それらの蛍光変化量によって分子間の相互作用を可視化する。両方の色素が、2種類の分子の相互作用によって近接したときのみドナー分子の

蛍光の減少とアクセプター分子の蛍光の増加が1波長励起2波長測光法により観測される。しかし、アクセプター分子に色素蛋白質を用いた場合は、両方の色素が、2種類の分子の相互作用によって近接したときのみドナー分子の蛍光の減少を生じ1波長励起1波長測光法により観測することができる。即ち、測定機器の簡易化が可能となる。

本発明の色素蛋白質は、特に、FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）におけるアクセプター分子としての利用価値が高い。即ち、本発明の色素蛋白質と被験物質との融合体（第一の融合体）を作製する。次いで、該被験物質と相互作用する別の被験物質と別の蛍光蛋白質との融合体（第2の融合体）を作製する。そして、第一の融合体と第2の融合体とを相互作用させ、発する蛍光を分析することにより、上記2種類の被験物質間の相互作用を分析することができる。なお、本発明の色素蛋白質を用いたFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）は、試験管内で行ってもよいし、細胞内で行ってもよい。

#### (7) 本発明のキット

本発明によれば、本明細書に記載した蛍光蛋白質、融合蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、細胞内成分の局在の分析及び／又は生理活性物質の分析のためのキットが提供される。本発明のキットは、それ自体既知の通常用いられる材料及び手法で調製することができる。

さらに本発明によれば、本明細書に記載した色素蛋白質、融合蛋白質、DNA、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、吸光試薬キットが提供される。本発明のキットは、それ自体既知の通常用いられる材料及び手法で調製することができる。

蛍光蛋白質、色素蛋白質又はDNAなどの試薬は、適当な溶媒に溶解することにより保存に適した形態に調製することができる。溶媒としては、水、エタノール、各種緩衝液などを用いることができる。

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

## 実施例

実施例 1 : イシサンゴからの新規蛍光蛋白遺伝子 (COG) の単離、並びに蛍光特性の解析

### (1) total RNA の抽出

珊瑚より蛍光蛋白質遺伝子の単離を行った。材料にはコモンサンゴ (*Montipora* sp.) を用いた。凍結したコモンサンゴを乳鉢で砕き、湿重量 2 グラムに "TRIzol" (GIBCO BRL) を 7.5 ml 加えてホモジナイズし、 $1500 \times g$  で 10 分間遠心した。上清にクロロホルム 1.5 ml をくわえ、15 秒間攪拌した後 3 分間静置した。 $7500 \times g$  で 15 分間遠心した。上清にイソプロパノール 3.75 ml をくわえ、15 秒間攪拌した後 10 分間静置した。 $17000 \times g$  で 10 分間遠心した。上清を捨て 70% エタノールを 6 ml 加えて  $17000 \times g$  で 10 分間遠心した。上清を捨て沈殿を DEPC 水  $200 \mu\text{l}$  で溶解した。DEPC 水で溶解した total RNA を 100 倍に希釈して O.D. 260 と O.D. 280 の値を測定して RNA 濃度を測った。 $22 \mu\text{g}$  の total RNA を得た。

### (2) First strand cDNA の合成

total RNA  $4 \mu\text{g}$  を使用し、First strand cDNA の合成キット "Ready To Go" (Amersham Pharmacia) により cDNA ( $33 \mu\text{l}$ ) を合成した。

### (3) Degenerated PCR

合成した First strand cDNA ( $33 \mu\text{l}$ ) のうち  $3 \mu\text{l}$  を鋳型として PCR を行った。

プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。

使用プライマー

5' -GAAGGRTGYGTCAAYGGRCAY-3' (primer 1) (配列番号 15)

5' -ACVGGDCCATYDGAAGAAARTT-3' (primer 2) (配列番号 16)

I=イノシン、R=A 又は G、Y=C 又は T、V=A、C 又は G、D=A、G 又は T S=C 又は G、



WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

H=A 又は T 又は C

## PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 taq バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer1	1 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer2	1 $\mu$ l
ミリ Q	35 $\mu$ l
taq polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

## PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (変性)

52°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 35 サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

一回目の PCR 反応で得られた増幅産物 1  $\mu$ l をテンプレートとして、もう一度同じ条件で PCR を行った。アガロースゲル電気泳動で、350 bp を切り出し、精製した。

## (4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してその DNA 塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5' -RACE 法およ

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

び 3' -RACE 法による遺伝子全長のクローニングを行った。

#### (5) 5' -RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 5' 側の塩基配列を決定するために 5' -RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL) を用いて、5' -RACE 法を行った。鋳型として (1) で調製した total RNA を 5  $\mu$ g 使用した。

dC-tailed cDNA の一回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (primer 3) (配列番号 17)

5' -CCATCTTCAAAGAGAAAAGACCTTT-3' (primer 4) (配列番号 18)

のプライマーを用いた。

I=イノシン

二回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (primer 5) (配列番号 19)

5' -CATGAGTTCTTGAAATAGTCAAC-3' (primer 6) (配列番号 20)

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 350 bp のバンドを切り出し、精製した。

精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株

(TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白

いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

#### (6) 3' -RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 3' 側部分は、(4) の塩基配列決定で得られた情報を基に作製したプライマーとオリゴ dT プライマーの PCR で得た。鋳型として (2) で調製した first strand cDNA を 3  $\mu$ l 使用した。

作成したプライマーは

5' -ATGGCTCTTTCAAAGCGAGGTG-3' (primer 7) (配列番号 21)

PCR 反応液組成

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 taq バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
20 $\mu$ M primer7	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴ dT primer	1 $\mu$ l
ミリ Q	35 $\mu$ l
taq polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

## PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (変性)

52°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

アガロースゲル電気泳動で、増幅された約 1000 bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

得られた全長の塩基配列を配列表の配列番号 2 に示し、全長のアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 に示す。このクローンを COG と命名した。

## (7) 大腸菌での蛋白発現

得られた全長の塩基配列より、蛋白の N 末端に相当する部分でプライマーを作製し、C 末端側はオリゴ dT プライマーを使用して、(2) で調製した First strand cDNA を鋳型として PCR を行った。

使用プライマー

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

5' -GGGGGATCCGACCATGGCTCTTTCAAAGCGAGGTG-3' (primer 8) (配列番号 2 2)

#### PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 pyrobest バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer8	1 $\mu$ l
100 $\mu$ M オリゴ dT プライマー	1 $\mu$ l
ミリ Q	35 $\mu$ l
pyrobest polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

#### PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (変性)

52°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された約 1000 bp のバンドを切り出し、精製して pRSET vector (Invitrogen) の BamH I、EcoR I 部位にサブクローニングして、大腸菌株 (JM109-DE3) で発現させた。発現蛋白は N 末端に His-tag が付くようにコンストラクトしたので発現蛋白は Ni-Agarose gel (QIAGEN) で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。次に精製した蛋白の性質を解析した。

#### (8) 蛍光特性の解析

20  $\mu$ M 蛍光蛋白 (COG)、150 mM KCl, 50 mM HEPES pH 7.5 溶液を用いて、吸収スペクトルを測定した (図 1 B)。このスペクトルのピーク (507 nm) の値よりモル吸光係数を計算した。450 nm の吸収が 0.002 となるように蛍光蛋白を上記の緩衝液で希釈し、450 nm で励起した時の蛍光スペクトルと 550 nm の蛍光による励

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

起スペクトルを測定した（図 1 A）。EGFP（CLONTECH）を同様に 450 nm の吸収が 0.002 となるようにして蛍光スペクトルを測定し、EGFP の量子収率を 0.6 として今回クローニングされた蛍光蛋白の量子収率を求めた。測定結果を表 1 に示す。

表 1

	励起極大	蛍光極大	モル吸光係数	量子収率	pH 感受性	アミノ酸数
COG	507 nm	517 nm	104,050 (507nm)	0.29	pKa=5.5	227

#### （9）pH 感受性の測定

蛍光蛋白を各緩衝液で同濃度に希釈し、507 nm の吸収の値をとり pH 感受性を測定した（図 1 C）。各 pH の緩衝液は次の通り、

pH 4、5 : 酢酸バッファー

pH 6、11 : リン酸バッファー

pH 7、8 : HEPES バッファー

pH 9、10 : グリシンバッファー

pH5 では pH 6～10 と較べて吸収のピークが 507 nm から 493 nm へ、蛍光のピークが 517 nm から 508 nm へと共に短波長側にシフトするという特性を持っていた。測定結果を図 2 A 及び B に示す。

#### 実施例 2 : 珊瑚からの新規蛍光蛋白遺伝子 (MIG) の単離

##### （1）total RNA の抽出

蛍光を放つ珊瑚より蛍光蛋白遺伝子の単離を行った。材料にはミドリイシ (*Acropora* sp.) を用いた。ミドリイシをハンマーで砕き、砕いたサンゴ 5 グラムに "TRIzol" (GIBCO BRL) を 15 ml 加えて攪拌し、1500×g で 10 分間遠心した。上清にクロロホルム 3 ml をくわえ、15 秒間攪拌した後 3 分間静置した。7500×g で 15 分間遠心した。上清にイソプロパノール 7.5 ml をくわえ、15 秒間攪拌した後 10 分間静置した。17000×g で 10 分間遠心した。上清を捨て 70% エタノー

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

ルを 6 ml 加えて  $17000 \times g$  で 10 分間遠心した。上清を捨て沈殿を DEPC 水  $200 \mu$  l で溶解した。DEPC 水で溶解した total RNA を 100 倍に希釈して O. D. 260 と O. D. 280 の値を測定して RNA 濃度を測った。 $220 \mu g$  の total RNA を得た。

## (2) First strand cDNA の合成

total RNA  $5 \mu g$  を使用し、First strand cDNA の合成キット "Ready To Go" (Amersham Pharmacia) により cDNA ( $33 \mu l$ ) を合成した。

## (3) Degenerated PCR

合成した First strand cDNA ( $33 \mu l$ ) のうち  $3 \mu l$  を鋳型として PCR を行った。プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。

### 使用プライマー

5' -GAAGGRTGYGTCAAYGGRCAY-3' (primer 1) (配列番号 15)

5' -ACVGGDCCATYDGVAAAGAAARTT-3' (primer 2) (配列番号 16)

R=A 又は G、Y=C 又は T、V=A、C 又は G、D=A、G 又は T

### PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)  $3 \mu l$

X10 taq バッファー  $5 \mu l$

2.5 mM dNTPs  $4 \mu l$

100  $\mu M$  primer1  $1 \mu l$

100  $\mu M$  primer2  $1 \mu l$

ミリ Q  $35 \mu l$

taq polymerase (5 U/ $\mu l$ )  $1 \mu l$

### PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (変性)

52°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

上記 3 ステップを 30 サイクル行い、アニーリング温度を 1 サイクルごとに 0.3°C 下げた。30 サイクル時の温度は 43°C。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

一回目の PCR 反応で得られた増幅産物 1 µl をテンプレートとして、もう一度同じ条件で PCR を行った。アガロースゲル電気泳動で予想された大きさの 350 bp のバンドを切り出し、精製した。

#### (4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してその DNA 塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5' -RACE 法および 3' -RACE 法による遺伝子全長のクローニングを行った。

#### (5) 5' -RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 5' 側の塩基配列を決定するために

5' -RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL) を用いて、5' -RACE 法を行った。鋳型として (1) で調製した total RNA を 3 µg 使用した。DC-tailed cDNA の一回目の増幅には、

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (primer 3) (配列番号 17)

5' -TAGAAATGACCTTTCATATGACATTC-3' (primer 4) (配列番号 23)

のプライマーを用いた。

I=イノシン

二回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (primer 5) (配列番号 19)

5' -TCTGTTTCCATATTGAAAGGCTG-3' (primer 6) (配列番号 24)

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 500 bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

#### (6) 3' -RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 3' 側部分は、(4) の塩基配列決定で得られた情報を基に作製したプライマーとオリゴ dT プライマーの PCR で得た。鋳型として (2) で調製した first strand cDNA を 3  $\mu$ l 使用した。

作成したプライマーは 5' -ATGGTGTCTTATTCAAAGCAAGGCATCGCACA-3' (primer 7)  
(配列番号 25)

#### PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 taq バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
20 $\mu$ M primer 7	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M oligo dT primer	1 $\mu$ l
ミリ Q	35 $\mu$ l
taq polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

#### PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (変性)

55°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)



WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

## 4°C 保持

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 900 bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイต์セクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

得られた全長の塩基配列を配列表の配列番号 4 に示し、全長のアミノ酸配列を配列表の配列番号 3 に示す。このクローンを MIG と命名した。

## (7) 大腸菌での蛋白発現

得られた全長の塩基配列より、蛋白の N 末端相当する部分で作製したプライマーとオリゴ dT プライマーを用い、(2) で調製した First strand cDNA を鋳型として PCR を行った。

## 使用プライマー

5' -CGGGATCCGACCATGGTGTCTTATTCAAAGCAAGGCATCGCACA -3' (primer 8) (配列番号 26)

## PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 pyrobest バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
20 $\mu$ M primer8	1 $\mu$ l
20 $\mu$ M oligo dT primer	1 $\mu$ l
ミリ Q	35 $\mu$ l
pyrobest polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

## PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (変性)

55°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された 900 bp のバンドを切り出し、精製して pRSET vector (Invitrogen) の BamH I、EcoR I 部位にサブクローニングして、大腸菌株 (JM109-DE3) で発現させた。N 末端に His-tag が付くようにコンストラクトしたので発現蛋白は Ni-Agarose gel (QIAGEN) で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。次に精製した蛋白の性質を解析した。

## (8) 蛍光特性の解析

20  $\mu$ M 蛍光蛋白 (MIG)、150 mM KCl、50 mM HEPES pH 7.4 溶液を用いて、吸収スペクトルを測定した (図 3 B)。このスペクトルのピーク (505 nm) の値よりモル吸光係数を計算した。440 nm の吸収が 0.001 となるように蛍光蛋白を上記の緩衝液で希釈し、440 nm で励起した時の蛍光スペクトルと 540 nm の蛍光による励起スペクトルを測定した (図 3 A)。EGFP (CLONTECH) を同様に 440 nm の吸収が 0.001 となるようにして蛍光スペクトルを測定し、EGFP の量子収率を 0.6 として今回クローニングされた蛍光蛋白の量子収率を求めた。測定結果は表 2 に示す。

表 2

	励起極大	蛍光極大	モル吸光係数	量子収率	pH 感受性	アミノ酸数
MIG	505nm	516nm	53600 (505nm)	0.67	pKa=6.4	232

## (9) pH 感受性の測定

蛍光蛋白を各緩衝液で希釈し、505 nm の吸収の値をとり pH 感受性を測定した。

各 pH の緩衝液は次の通り、

pH 4、5 : 酢酸バッファー

pH 6、11 : リン酸バッファー

pH 7、8 : HEPES バッファー

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

pH 9、10 : グリシンバッファー

測定結果を図 3 C に示す。

### 実施例 3 : 珊瑚からの新規蛍光蛋白遺伝子(MiCy)の単離

#### (1) total RNA の抽出

蛍光を放つ珊瑚より蛍光蛋白遺伝子の単離を行った。材料にはミドリイシ (*Acropora* sp.) を用いた。ミドリイシをハンマーで砕き、砕いたサンゴ 5 グラムに "TRIzol" (GIBCO BRL) を 15 ml 加えて攪拌し、 $1500\times g$  で 10 分間遠心した。上清にクロロホルム 3ml をくわえ、15 秒間攪拌した後 3 分間静置した。 $7500\times g$  で 15 分間遠心した。上清にイソプロパノール 7.5 ml をくわえ、15 秒間攪拌した後 10 分間静置した。 $17000\times g$  で 10 分間遠心した。上清を捨て 70% エタノールを 6 ml 加えて  $17000\times g$  で 10 分間遠心した。上清を捨て沈殿を DEPC 水 200  $\mu$  l で溶解した。DEPC 水で溶解した total RNA を 100 倍に希釈して O. D. 260 と O. D. 280 の値を測定して RNA 濃度を測った。220  $\mu$  g の total RNA を得た。

#### (2) First strand cDNA の合成

total RNA 5  $\mu$  g を使用し、First strand cDNA の合成キット "Ready To Go" (Amersham Pharmacia) により cDNA (33  $\mu$  l) を合成した。

#### (3) Degenerated PCR

合成した First strand cDNA (33  $\mu$  l) のうち 3  $\mu$  l を鋳型として PCR を行った。プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。

#### 使用プライマー

5' -GAAGGRTGYGTCAAYGGRCAY-3' (primer 1) (配列番号 15)

5' -ACVGGDCCATYDGVAAGAAARTT-3' (primer 2) (配列番号 16)

R=A 又は G、Y=C 又は T、V=A、C 又は G、D=A、G 又は T

#### PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA) 3  $\mu$  l

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

X10 taq バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer1	1 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer2	1 $\mu$ l
ミリ Q	35 $\mu$ l
taq polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

## PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (変性)

52°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行い、アニーリング温度を 1 サイクルごとに 0.3°C 下げた。30 サイクル時の温度は 43°C。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

一回目の PCR 反応で得られた増幅産物 1  $\mu$  l をテンプレートとして、もう一度同じ条件で PCR を行った。アガロースゲル電気泳動で予想された大きさの 350 bp のバンドを切り出し、精製した。

## (4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイต์セレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シーケンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してその DNA 塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5' -RACE 法および 3' -RACE 法による遺伝子全長のクローニングを行った。

## (5) 5' -RACE 法

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 5' 側の塩基配列を決定するために 5' -RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL) を用いて、5' -RACE 法を行った。鋳型として (1) で調製した total RNA を 3  $\mu$ g 使用した。DC-tailed cDNA の一回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (primer 3) (配列番号 17)

5' - TAGAAATGACCTTTCATATGACATTC -3' (primer 4) (配列番号 27)

のプライマーを用いた。

I=イノシン

二回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (primer 5) (配列番号 19)

5' - TCTGTTTCCATATTGAAAGGCTG -3' (primer 6) (配列番号 28)

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 500 bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シーケンサーにより決定した。

#### (6) 3' -RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 3' 側部分は、(4) の塩基配列決定で得られた情報を基に作製したプライマーとオリゴdT プライマーの PCR で得た。鋳型として (2) で調製した first strand cDNA を 3  $\mu$ l 使用した。

作成したプライマーは 5' -ATGGTGTCTTATTCAAAGCAAGGCATCGCACA-3' (primer 7)

(配列番号 29)

#### PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 taq バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

20 $\mu$ M primer 7	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M oligo dT primer	1 $\mu$ l
ミリ Q	35 $\mu$ l
taq polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

## PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (変性)

55°C 30 sec (鑄型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 900 bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シーケンサーにより決定した。

得られた全長の塩基配列を配列表の配列番号 6 に示し、全長のアミノ酸配列を配列表の配列番号 5 に示す。このクローンを MICy と命名した。

## (7) 大腸菌での蛋白発現

得られた全長の塩基配列より、蛋白の N 末端相当する部分で作製したプライマーとオリゴ dT プライマーを用い、(2) で調製した First strand cDNA を鑄型として PCR を行った。

## 使用プライマー

5' -CGGGATCCGACCATGGTGTCTTATTCAAAGCAAGGCATCGCACA -3' (primer 8) (配列番号 30)

## PCR 反応液組成

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 pyrobest バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
20 $\mu$ M primer8	1 $\mu$ l
20 $\mu$ M oligo dT primer	1 $\mu$ l
ミリ Q	35 $\mu$ l
pyrobest polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (変性)

55°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された 900 bp のバンドを切り出し、精製して pRSET vector (Invitrogen) の BamH I、EcoR I 部位にサブクローニングして、大腸菌株 (JM109-DE3) で発現させた。N 末端に His-tag が付くようにコンストラクトしたので発現蛋白は Ni-Agarose gel (QIAGEN) で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。次に精製した蛋白の性質を解析した。

#### (8) 蛍光特性の解析

20  $\mu$ M 蛍光蛋白 (MICy)、150 mM KCl、50 mM HEPES pH7.4 溶液を用いて、吸収スペクトルを測定した (図 4 B)。このスペクトルのピーク (472nm) の値よりモル吸光係数を計算した。440 nm の吸収が 0.001 となるように蛍光蛋白を上記の緩衝液で希釈し、440 nm で励起した時の蛍光スペクトルと 540 nm の蛍光による励起スペクトルを測定した (図 4 A)。EGFP (CLONTECH) を同様に 440 nm の吸収が 0.001 となるようにして蛍光スペクトルを測定し、EGFP の量子収率を 0.6 として

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

今回クローニングされた蛍光蛋白の量子収率を求めた。測定結果を表3に示す。

表 3

	励起極大	蛍光極大	モル吸光 係数	量子収率	pH 感受性	アミノ酸数
MIcY	472nm	496nm	27250 (472nm)	0.90	pKa=6.6	232

#### (9) pH 感受性の測定

蛍光蛋白を各緩衝液で希釈し、472 nmの吸収の値をとり pH感受性を測定した。

各 pH の緩衝液は次の通り、

pH 4、5 : 酢酸バッファー

pH 6、11 : リン酸バッファー

pH 7、8 : HEPES バッファー

pH 9、10 : グリシンバッファー

測定結果を図4Cに示す。

#### (10) MIcY の pH 耐性変異体 MIcY2 の作製

MIcY の 166 番目のグルタミン (Q) をヒスチジン (H) に置換することにより MIcY に比べて酸性側での蛍光強度が強い MIcY2 となった (アミノ酸配列を配列番号 7 に示し、塩基配列を配列番号 8 に示す)。具体的には pKa=6.6 から pKa=5.6 に下がり、蛍光のピークは 493nm、励起のピークは 462nm となった (図 5 の A 及び B)。

#### 実施例 4 : イシサンゴからの新規蛍光蛋白遺伝子 (COR) の単離、並びに蛍光特性の解析

##### (1) total RNA の抽出

珊瑚より蛍光蛋白遺伝子の単離を行った。材料にはコモンサンゴ (*Montipora sp.*) を用いた。凍結したコモンサンゴを乳鉢で碎き、湿重量 2 グラムに "TRIzol"

(GIBCO BRL) を 7.5 ml 加えてホモジナイズし、1500×g で 10 分間遠心した。上



WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

清にクロロホルム 1.5 ml をくわえ、15 秒間攪拌した後 3 分間静置した。7500×g で 15 分間遠心した。上清にイソプロパノール 3.75 ml をくわえ、15 秒間攪拌した後 10 分間静置した。17000×g で 10 分間遠心した。上清を捨て 70%エタノールを 6 ml 加えて 17000×g で 10 分間遠心した。上清を捨て沈殿を DEPC 水 200  $\mu$ l で溶解した。DEPC 水で溶解した total RNA を 100 倍に希釈して O.D. 260 と O.D. 280 の値を測定して RNA 濃度を測った。22  $\mu$ g の total RNA を得た。

## (2) First strand cDNA の合成

total RNA 4  $\mu$ g を使用し、First strand cDNA の合成キット” Ready To Go” (Amersham Pharmacia)により cDNA (33  $\mu$ l)を合成した。

## (3) Degenerated PCR

合成した First strand cDNA (33  $\mu$ l)のうち 3  $\mu$ l を鋳型として PCR を行った。

プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。

### 使用プライマー

5' -GAAGGRTGYGTCAAYGGRCAY-3' (primer 1) (配列番号 15)

5' -ACVGGDCCATYDGVAAGAAARTT-3' (primer 2) (配列番号 16)

I=イノシン、R=A 又は G、Y=C 又は T、V=A、C 又は G、D=A、G 又は T S=C 又は G、

H=A 又は T 又は C

### PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA) 3  $\mu$ l

X10 taq バッファー 5  $\mu$ l

2.5 mM dNTPs 4  $\mu$ l

100  $\mu$ M primer1 1  $\mu$ l

100  $\mu$ M primer2 1  $\mu$ l

ミリ Q 35  $\mu$ l

taq polymerase (5 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l

### PCR 反応条件

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (変性)

52°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記3ステップを35サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

一回目のPCR反応で得られた増幅産物 1 ul をテンプレートとして、もう一度同じ条件でPCRを行った。アガロースゲル電気泳動で、350 bp を切り出し、精製した。

#### (4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製したDNA断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してそのDNA塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5' -RACE 法および3' -RACE 法による遺伝子全長のクローニングを行った。

#### (5) 5' -RACE 法

Degenerated PCR で得られたDNA断片の5'側の塩基配列を決定するために5' -RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL) を用いて、5' -RACE 法を行った。鋳型として(1)で調製したtotal RNA を5 µg 使用した。

dC-tailed cDNA の一回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (primer 3) (配列番号17)

5' -CCATCTTCAAAGAGAAAAGACCTTT-3' (primer 4) (配列番号18)

のプライマーを用いた。

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

I=イノシン

二回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (primer 5) (配列番号 19)

5' -CATGAGTTCTTGAAATAGTCAAC-3' (primer 6) (配列番号 20)

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 350bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

#### (6) 3' -RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 3' 側部分は、(4) の塩基配列決定で得られた情報を基に作製したプライマーとオリゴ dT プライマーの PCR で得た。鋳型として (2) で調製した first strand cDNA を 3  $\mu$ l 使用した。

作成したプライマーは

5' -ATGGCTCTTTCAAAGCACGGTC-3' (primer 7) (配列番号 31)

#### PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 taq バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
20 $\mu$ M primer7	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴ dT primer	1 $\mu$ l
ミリ Q	35 $\mu$ l
taq polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

#### PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (変性)

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

52°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記3ステップを30サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

アガロースゲル電気泳動で、増幅された約 1000bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

得られた全長の塩基配列を配列表の配列番号 10 に示し、全長のアミノ酸配列を配列表の配列番号 9 に示す。このクローンを COR と命名した。

#### (7) 大腸菌での蛋白発現

得られた全長の塩基配列より、蛋白の N 末端に相当する部分でプライマーを作製し、C 末端側はオリゴ dT プライマーを使用して、(2) で調製した First strand cDNA を鋳型として PCR を行った。

使用プライマー

5' -GGGGGATCCGACCATGGCTCTTTCAAAGCACGGTC-3' (primer 8) (配列番号 32)

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 pyrobest バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer8	1 $\mu$ l
100 $\mu$ M オリゴ dT プライマー	1 $\mu$ l
ミリ Q	35 $\mu$ l
pyrobest polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

PCR 反応条件

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (変性)

52°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記3ステップを30 サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された約 1000 bp のバンドを切り出し、精製して pRSET vector (Invitrogen) の *Bam*HI、*Eco*RI 部位にサブクローニングして、大腸菌株 (JM109-DE3) で発現させた。発現蛋白は N 末端に His-tag が付くようにコンストラクトしたので発現蛋白は Ni-Agarose gel (QIAGEN) で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。次に精製した蛋白の性質を解析した。

## (8) 蛍光特性の解析

20  $\mu$ M 蛍光蛋白 (COR)、150 mM KCl, 50 mM HEPES pH 7.5 溶液を用いて、吸収スペクトルを測定した (図 6 B)。このスペクトルのピーク (557 nm) の値よりモル吸光係数を計算した。520 nm の吸収が 0.002 となるように蛍光蛋白を上記の緩衝液で希釈し、520 nm で励起した時の蛍光スペクトルと 600 nm の蛍光による励起スペクトルを測定した (図 6 A)。DsRed2 (CLONTECH) を同様に 520 nm の吸収が 0.002 となるようにして蛍光スペクトルを測定し、DsRed2 の量子収率を 0.55 とし、今回クローニングされた蛍光蛋白の量子収率を求めた。測定結果を表 4 に示す。

表 4

	励起極大	蛍光極大	モル吸光 係数	量子収率	pH 感受性	アミノ酸数
COR	557nm	574nm	41750 (557nm)	0.41	pKa<4.0	232

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

### (9) pH感受性の測定

蛍光蛋白を各緩衝液で同濃度に希釈し、557 nmの吸収の値をとりpH感受性を測定した。各pHの緩衝液は次の通り、

pH 4、5 : 酢酸バッファー

pH 6、11 : リン酸バッファー

pH 7、8 : HEPES バッファー

pH 9、10 : グリシンバッファー

測定結果を図6Cに示す。

実施例5：イソギンチャクからの新規色素蛋白遺伝子の単離、並びに光吸収特性の解析

#### (1) total RNAの抽出

イソギンチャクより色素蛋白遺伝子の単離を行った。材料には赤色を呈する1個体のウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) を用いた。凍結したウメボシイソギンチャクを乳鉢で碎き、湿重量1グラムに”TRIzol” (GIBCO BRL) を7.5 ml 加えてホモジナイズし、1500×g で10分間遠心した。上清にクロロホルム1.5 ml をくわえ、15秒間攪拌した後3分間静置した。7500×g で15分間遠心した。上清にイソプロパノール3.75 ml をくわえ、15秒間攪拌した後10分間静置した。17000×g で10分間遠心した。上清を捨て70%エタノールを6 ml 加えて17000×g で10分間遠心した。上清を捨て沈殿をDEPC水200 μl で溶解した。DEPC水で溶解したtotal RNAを100倍に希釈してO.D. 260とO.D. 280の値を測定してRNA濃度を測った。1.2 mgのtotal RNAを得た。

#### (2) First strand cDNAの合成

total RNA 4 μg を使用し、First strand cDNAの合成キット”Ready To Go” (Amersham Pharmacia)によりcDNA(33 μl)を合成した。

#### (3) Degenerated PCR

合成したFirst strand cDNA(33 μl)のうち3 μlを鋳型としてPCRを行った。

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。

#### 使用プライマー

5' - GGI WSB GTI AAY GGV CAY DAN TT -3' (primer1) (配列番号 3 3)

5' - GTC ITC TTY TGC ACI ACI GGI CCA TYD GVA GGA AA -3' (primer2) (配列番号 3 4)

I=イノシン、R=A 又は G、Y=C 又は T、V=A, C 又は G、D=A, G 又は T S=C 又は G、H=A 又は T 又は C

#### PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 taq バッファー	5 $\mu$ l
2.5mM dNTPs	4 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer1	1 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer2	1 $\mu$ l
ミリ Q	35 $\mu$ l
taq polymerase (5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

#### PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (denaturation)

58°C 30 sec (annealing of primers to template)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 35 サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

一回目の PCR 反応で得られた増幅産物 1  $\mu$  l をテンプレートとして、もう一度同じ条件で PCR を行った。アガロースゲル電気泳動で、350 bp を切り出し、精製した。

#### (4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してその DNA 塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5' -RACE 法および 3' -RACE 法による遺伝子全長のクローニングを行った。

#### (5) 5' -RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 5' 側の塩基配列を決定するために 5' -RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL) を用いて、5' -RACE 法を行った。鋳型として (1) で調製した total RNA を 4  $\mu$ g 使用した。

赤色の個体由来の DC-tailed cDNA の一回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (primer3) (配列番号 17)

5' - CCT TGA AAA TAA AGC TAT CT-3' (primer4) (配列番号 35)

のプライマーを用いた。

I=イノシン

二回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (primer5) (配列番号 19)

5' - CCC TGT ATG CTT GTG TCC TG-3' (primer6) (配列番号 36)

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 200 bp のバンドを切り出し、精製した。

精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。



WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

## (6) 全塩基配列の決定、及び大腸菌での蛋白発現

(5) により得られた蛋白の N 末端に相当する部分でプライマーを作製し、C 末端側はオリゴ dT プライマーを使用して、(2) で調製した First strand cDNA を鋳型として PCR を行った。

使用プライマー

5' - CCC GGA TCC GAC CAT GGT GTC TTC ATT GGT TAA GAA -3' (primer7) (配列番号 37)

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 pyrobest バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer8	1 $\mu$ l
100 $\mu$ M オリゴ dT プライマー	1 $\mu$ l
ミリ Q	35 $\mu$ l
pyrobest polymerase (5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)  
94°C 30 sec (変性)  
52°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)  
72°C 1 min (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された約 900 bp のバンドを切り出し、精製して pRSET vector (Invitrogen) の BamHI、EcoRI 部位にサブクローニングして、大腸菌株 (JM109-DE3) で発現させた。またプラスミドを回収し、挿入された全塩基配列を決定した。クローン名は Ume とした。全塩基配列および全アミノ酸配列

を配列表の配列番号 1 2 及び配列番号 1 1 に示す。発現蛋白は N 末端に His-tag が付くようにコンストラクトしたので発現蛋白は Ni-Agarose gel (QIAGEN) で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。次に精製した蛋白の性質を解析した。

#### (7) 光吸収特性の解析

10  $\mu$ M 色素蛋白 (Ume)、50 mM HEPES pH7.9 溶液を用いて吸収スペクトルを測定した。このスペクトルのピークの値よりモル吸光係数を計算した。赤色の個体由来色素蛋白 (Ume) では 592 nm に吸収のピークが認められた (図 7 A)。測定結果は表 5 に示す。

表 5

	吸収極大	モル吸光係数	pH 感受性	アミノ酸数
Ume	592nm	87000 (592nm)	pH5~10で安定	232

#### (9) pH 感受性の測定

50 mM の下記の緩衝液中で蛋白質の吸収スペクトルを測定した (図 7 B)。

各 pH の緩衝液は次の通り、

pH4、5 : 酢酸バッファー

pH6 : リン酸バッファー

pH7、8 : HEPES バッファー

pH9、10 : グリシンバッファー

pH5~10 でピークの値は安定していた。

#### 実施例 6 : 珊瑚 (ウミキノコ) からの新規蛍光蛋白遺伝子の単離

##### (1) total RNA の抽出

蛍光を放つ珊瑚より蛍光蛋白遺伝子の単離を行った。材料にはウミキノコ (*Lobophytum crassum*) を用いた。珊瑚をハンマーで砕き、湿重量 4 グラムに "TRIzol" (GIBCO BRL) を 7.5 ml 加えて攪拌し、1500×g で 10 分間遠心し

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

た。上清にクロロホルム 1.5 ml をくわえ、15 秒間攪拌した後 3 分間静置した。7500 ×g で 15 分間遠心した。上清にイソプロパノール 3.75 ml をくわえ、15 秒間攪拌した後 10 分間静置した。17000×g で 10 分間遠心した。上清を捨て 70% エタノールを 6 ml 加えて 17000×g で 10 分間遠心した。上清を捨て沈殿を DEPC 水 200 μl で溶解した。DEPC 水で溶解した total RNA を 100 倍に希釈して O.D. 260 と O.D. 280 の値を測定して RNA 濃度を測った。390 μg の total RNA を得た。

## (2) First strand cDNA の合成

total RNA 3 μg を使用し、First strand cDNA の合成キット "Ready To Go" (Amersham Pharmacia) により cDNA (33 μl) を合成した。

## (3) Degenerated PCR

合成した First strand cDNA (33 μl) のうち 3 μl を鋳型として PCR を行った。プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。

### 使用プライマー

5' - GRR AGG IWS BGT HAA YGG VCA -3' (Primer1) (配列番号 38)

5' - AACTGGAAGAATTCGCGCCGCGAGGAA -3' (Primer2) (配列番号 39)

R=A 又は G、Y=C 又は T、V=A, C 又は G、D=A, G 又は T

### PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μl
X10 taq バッファー	5 μl
2.5 mM dNTPs	4 μl
100 μM primer1	1 μl
100 μM primer2	1 μl
ミリ Q	35 μl
taq polymerase (5U/μl)	1 μl

### PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

94°C 30 sec (変性)

52°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

一回目の PCR 反応で得られた増幅産物 1  $\mu$ l をテンプレートとして、もう一度同じ温度条件で PCR を行った。ただし、使用プライマーは、

5' - GRR AGG IWS BGT HAA YGG VCA-3' (Primer1) (配列番号 38)

5' - GTC ITC TTY TGC ACI ACI GGI CCA TYD GVA GGA AA -3' (Primer3) (配列番号 40)

アガロースゲル電気泳動で、予想された大きさの 350 bp のバンドを切り出し、精製した。

#### (4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してその DNA 塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5' -RACE 法および 3' -RACE 法による遺伝子全長のクローニングを行った。

#### (5) 5' -RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 5' 側の塩基配列を決定するために 5' -RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL) を用いて、5' -RACE 法を行った。鋳型として 1) で調整した total RNA を 3ug 使用した。

DC-tailed cDNA の一回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (Primer4) (配列番号 17)

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

5' - TTG TCA AGA TAT CGA AAG CGA ACG GCA GAG -3' (Primer5) (配列番号 4  
1)

のプライマーを用いた。

I=イノシン

二回目の増幅には

5' -GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (Primer6) (配列番号 4 2)

5' - CTT CTC ACG TTG CAA ATG GC-3' (Primer7) (配列番号 4 3)

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 600 bp のバンドを切り出し、精製した。  
精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株  
(TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白  
いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配  
列を DNA シークエンサーにより決定した。

(6) 全塩基配列の決定、及び大腸菌での蛋白発現

(5) により得られた蛋白の N 末端に相当する部分でプライマーを作製し、C  
末端側はオリゴ dT プライマーを使用して、2) で調整した First strand cDNA  
を鋳型として PCR を行った。

使用プライマー

5' - CCC GGA TCC GAT GAG TGT GAT TAC AWC AGA AAT GAA GAT GGA GC -3' (Primer8)  
(配列番号 4 4)

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 pyrobest バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer8	1 $\mu$ l
100 $\mu$ M オリゴ dT プライマー	1 $\mu$ l
ミリ Q	35 $\mu$ l

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

pyrobest polymerase (5U/ $\mu$ l)      1  $\mu$ l

PCR 反応条件

94°C 1 min (PAD)

94°C 30 sec (変性)

52°C 30 sec (鑄型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された約 900bp のバンドを切り出し、精製して pRSET vector (Invitrogen) の *Bam*HI、*Eco*R I 部位にサブクローニングして、大腸菌株 (JM109-DE3) で発現させた。またプラスミドを回収し、挿入された全塩基配列を決定した。クローン名を KnG とした。得られた全長の塩基配列を配列表の配列番号 1 4 に示し、全長のアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 3 に示す。

発現蛋白は N 末端に His-tag が付くようにコンストラクトしたので発現蛋白は Ni-Agarose gel (QIAGEN) で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。次に精製した蛋白の性質を解析した。

#### (7) 蛍光特性の解析

10  $\mu$ M 蛍光蛋白 (KnG)、50 mM HEPES (pH7.9) 溶液を用いて吸収スペクトルを測定した (図 8 A)。このスペクトルのピークの値よりモル吸光係数を計算した。482 nm に吸収のピークが認められ、450 nm における吸収が 0.005 となるように蛍光蛋白を上記の緩衝液で希釈して、450 nm で励起した時の蛍光スペクトルを測定した (図 8 A)。EGFP (CLONTECH) を同様に 450 nm における吸収が 0.005 となるようにして蛍光スペクトルを測定し、EGFP の量子収率を 0.6 として新規蛋白質の量子収率を求めた。結果を表 6 に示す。

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

表 6

	励起極大	蛍光極大	モル吸光 係数	量子収率	pH 感受性	アミノ酸数
KnG	482nm	498nm	71000 (482nm)	0.41	pH4~10 で安定	224

## (8) pH 感受性の測定

下記の緩衝液で希釈して蛍光スペクトルを測定した。

各 pH の緩衝液は次の通り、

pH4、5 : 酢酸バッファー

pH6 : MES バッファー

pH7 : MOPS バッファー

pH8 : HEPES バッファー

pH9、10 : グリシンバッファー

pH11 : リン酸バッファー

結果を図 8 B に示す。

## 産業上の利用可能性

本発明により、コモンサンゴ (*Montipora* sp.)、ミドリイシ (*Acropora* sp.)、及びウミキノコ (*Lobophytum crassum*) 由来の新規な蛍光蛋白質が提供されることになった。本発明の蛍光蛋白質は、従来の蛍光蛋白質とは一次構造が異なる新規な蛋白質である。本発明の蛍光蛋白質は、所定の蛍光特性を有し、分子生物学的分析において有用である。即ち、本発明の蛍光蛋白質を用いることにより哺乳類細胞で毒性を発揮することなく蛍光ラベルができるようになった。また、本発明の蛍光蛋白質に変異を導入することにより、より新しい蛍光特性を生み出すことができる。

また、本発明の蛍光蛋白質 (COR) は、従来の RFP (DsRed、クロンテック社)

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

の示す幅広い励起スペクトルに比べ、よりシャープなスペクトルを有している。  
また、本発明の蛍光蛋白質に変異を導入することにより、赤色領域の蛍光特性をより多様化させることができる。

さらに本発明により、ウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) 由来の新規な色素蛋白質が提供されることになった。本発明の色素蛋白質は赤の領域に吸収を示すものであり、また pH 感受性が低いことから、分子生物学的分析において有用である。また、本発明の色素蛋白質の吸収度 (モル吸光係数) は著しく大きいため、光エネルギーの高効率な変換が可能である。また、遺伝子改変技術によって本発明の色素蛋白質の量子収率を 1 に近づけることも可能であり、その場合、新規な蛍光蛋白質を作製することができる。



WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

## 請求の範囲

1. コモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 励起極大波長が 507 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 517 nm である；
- (3) 507 nm におけるモル吸光係数が 104050 である；
- (4) 量子収率が 0.29 である；
- (5) 光吸収特性の pH 感受性が  $pK_a = \text{約} 5.5$  である；

2. ミドリイシ (*Acropora* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 励起極大波長が 505 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 516 nm である；
- (3) 505 nm におけるモル吸光係数が 53600 である；
- (4) 量子収率が 0.67 である；
- (5) 光吸収特性の pH 感受性が  $pK_a = \text{約} 6.4$  である；

3. ミドリイシ (*Acropora* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 励起極大波長が 472 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 496 nm である；
- (3) 472 nm におけるモル吸光係数が 27250 である；
- (4) 量子収率が 0.90 である；
- (5) 光吸収特性の pH 感受性が  $pK_a = \text{約} 6.6$  である；

4. コモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 励起極大波長が 557 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 574 nm である；
- (3) 557 nm におけるモル吸光係数が 41750 である；
- (4) 量子収率が 0.41 である；
- (5) 光吸収特性の pH 感受性が  $pK_a < \text{約} 4.0$  である；

5. ウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) 由来の下記の特性を有する

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

色素蛋白質。

- (1) 吸収極大波長が 592 nm である；
- (2) 592 nm におけるモル吸光係数が 87000 である；
- (3) 光吸収特性の pH 感受性が pH 5～10 で安定である；

6. ウミキノコ (*Lobophytum crassum*) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 励起極大波長が 482 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 498 nm である；
- (3) 482 nm におけるモル吸光係数が 71000 である；
- (4) 量子収率が 0.41 である；
- (5) 蛍光極大の pH 感受性が pH = 4～10 で安定である；

7. 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光を有するアミノ酸配列；

8. 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

- (a) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光を有するアミノ酸配列；

9. 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

- (a) 配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光を有するアミノ酸配列；

10. 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

- (a) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、

置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光を有するアミノ酸配列：

1 1. 以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質。

(a) 配列番号 1 1 に記載のアミノ酸配列；又は、

(b) 配列番号 1 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列：

1 2. 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

(a) 配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列；又は、

(b) 配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光を有するアミノ酸配列：

1 3. 請求項 1 から 1 2 の何れかに記載の蛋白質をコードする DNA。

1 4. 以下の何れかの DNA。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光蛋白質をコードする DNA：

1 5. 以下の何れかの塩基配列を有する DNA。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列；又は、

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、蛍光蛋白質をコードする塩基配列：

1 6. 以下の何れかの DNA。

(a) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、

(b) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光蛋白質をコードする DNA：

1 7. 以下の何れかの塩基配列を有する DNA。

(a) 配列番号 4 に記載の塩基配列；又は、

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

(b) 配列番号 4 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、蛍光蛋白質をコードする塩基配列：

18. 以下の何れかの DNA。

(a) 配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、

(b) 配列番号 5 又は 7 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光蛋白質をコードする DNA：

19. 以下の何れかの塩基配列を有する DNA。

(a) 配列番号 6 又は 8 に記載の塩基配列；又は、

(b) 配列番号 6 又は 8 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、蛍光蛋白質をコードする塩基配列：

20. 以下の何れかの DNA。

(a) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、

(b) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光蛋白質をコードする DNA：

21. 以下の何れかの塩基配列を有する DNA。

(a) 配列番号 10 に記載の塩基配列；又は、

(b) 配列番号 10 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、蛍光蛋白質をコードする塩基配列：

22. 以下の何れかの DNA。

(a) 配列番号 11 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、

(b) 配列番号 11 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする DNA：

23. 以下の何れかの塩基配列を有する DNA。

(a) 配列番号 12 に記載の塩基配列；又は、

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

(b) 配列番号 1 2 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

24. 以下の何れかの DNA。

(a) 配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、

(b) 配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光蛋白質をコードする DNA：

25. 以下の何れかの塩基配列を有する DNA。

(a) 配列番号 1 4 に記載の塩基配列；又は、

(b) 配列番号 1 4 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、蛍光蛋白質をコードする塩基配列：

26. 請求項 1 3 から 2 5 の何れかに記載の DNA を有する組み換えベクター。

27. 請求項 1 3 から 2 5 の何れかに記載の DNA 又は請求項 2 6 に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

28. 請求項 1 から 4、6、7 から 10 又は 1 2 の何れかに記載の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛍光蛋白質。

29. 他の蛋白質が細胞内に局在する蛋白質である、請求項 2 8 に記載の融合蛍光蛋白質。

30. 他の蛋白質が細胞内小器官に特異的な蛋白質である、請求項 2 8 又は 2 9 に記載の融合蛍光蛋白質。

31. 請求項 5 又は 1 1 に記載の色素蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛋白質。

32. 請求項 2 8 から 3 0 の何れかに記載の融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法。

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

33. 請求項5又は11に記載の色素蛋白質をアクセプター蛋白質として用いてFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）法を行うことを特徴とする、生理活性物質の分析方法。

34. 1から4、6、7から10又は12の何れかに記載の蛍光蛋白質、請求項14から21、24又は25の何れかに記載のDNA、請求項26に記載の組み換えベクター、請求項27に記載の形質転換体、又は請求項28から30の何れかに記載の融合蛍光蛋白質を含む、蛍光試薬キット。

35. 請求項5又は11に記載の色素蛋白質、請求項22又は23に記載のDNA、請求項26に記載の組み換えベクター、請求項27に記載の形質転換体、又は請求項31に記載の融合蛋白質を含む、吸光試薬キット。

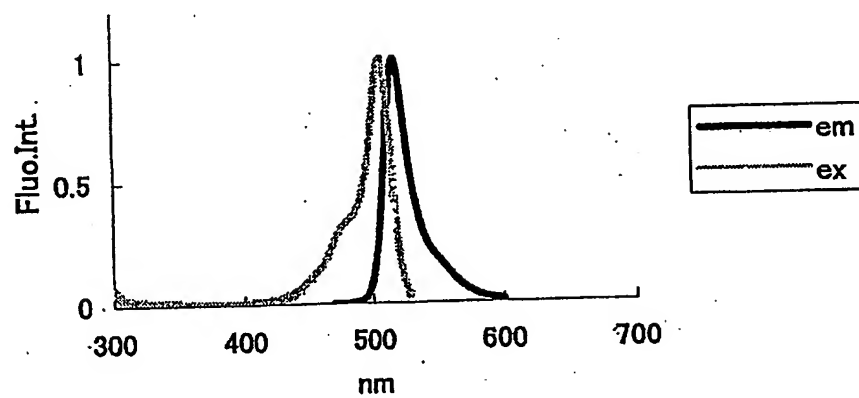
WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

1

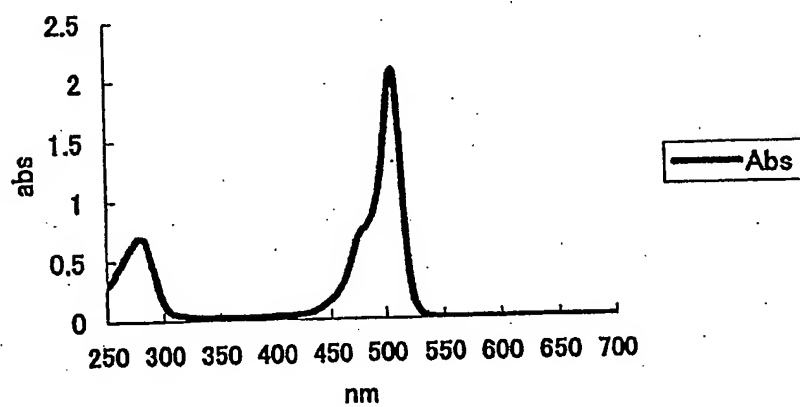
A

COG



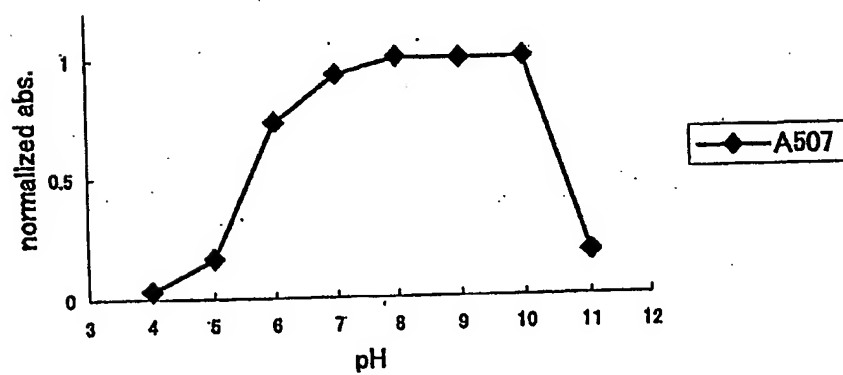
B

COG



C

A507



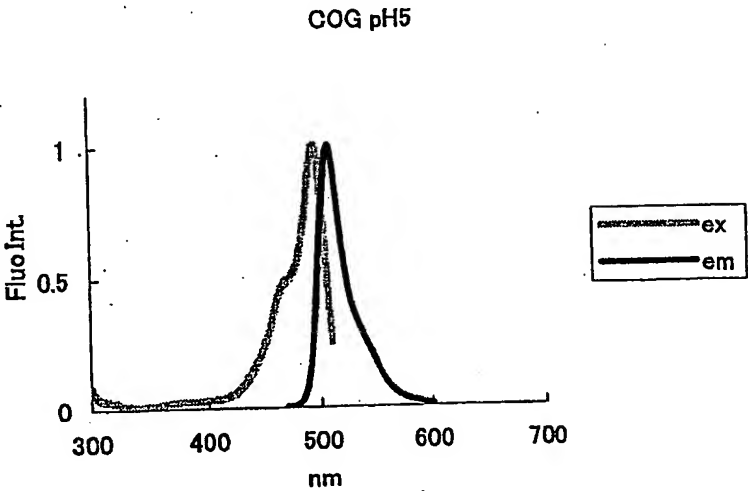
WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

図 2

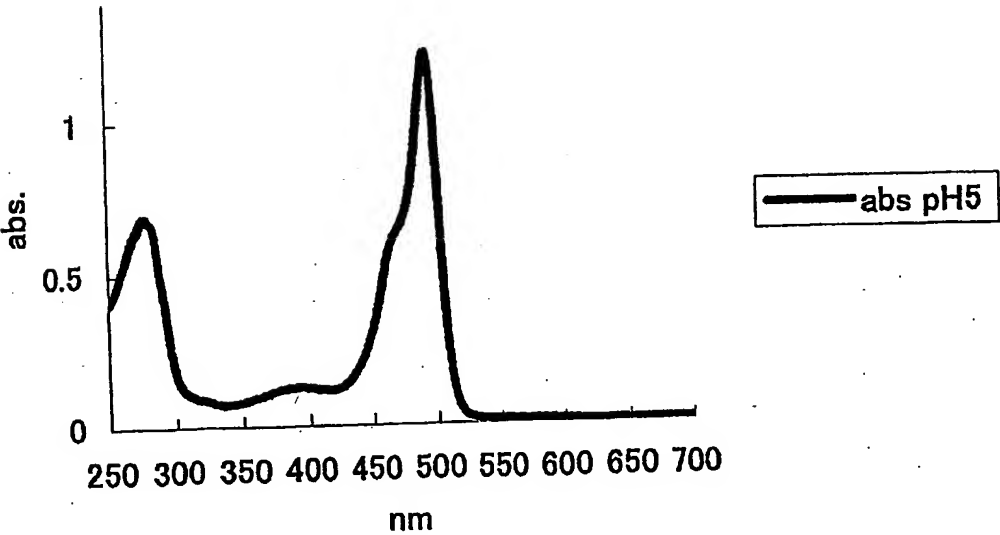
A

	励起極大	蛍光極大
COG pH 5	493 nm	508 nm



B

abs pH5





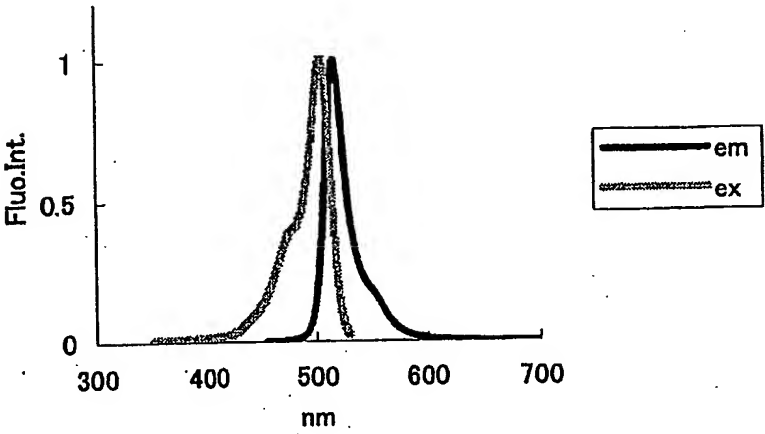
WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

3

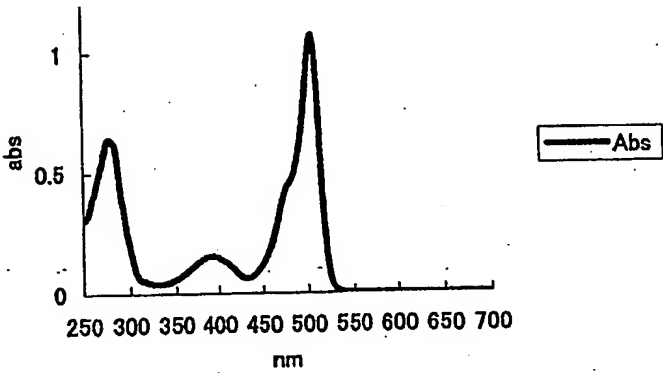
MIG

A



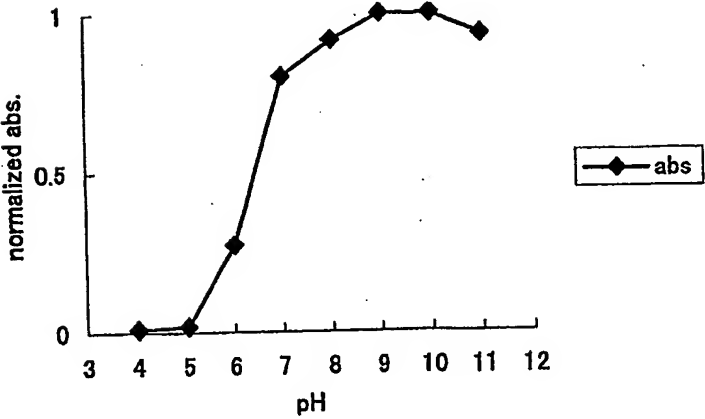
B

MIG



C

MIG

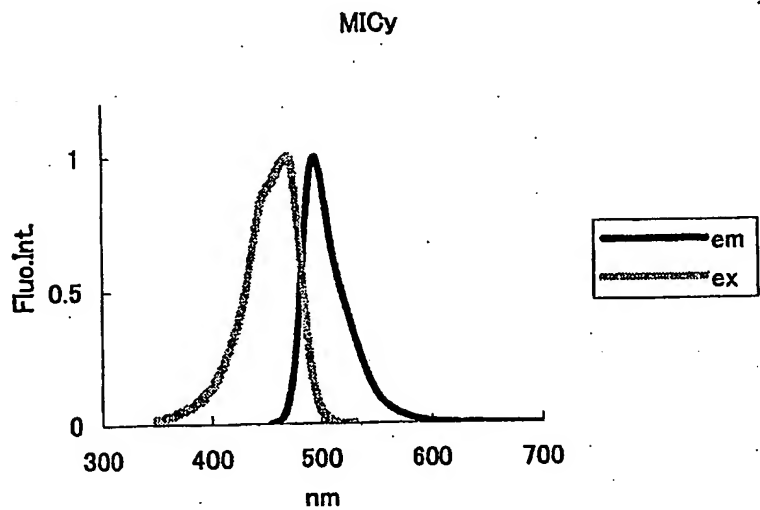


WO 2004/111235

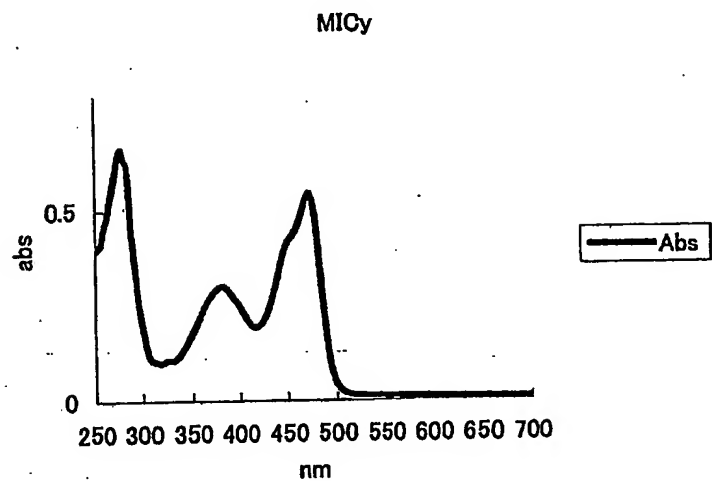
PCT/JP2004/008786

図 4

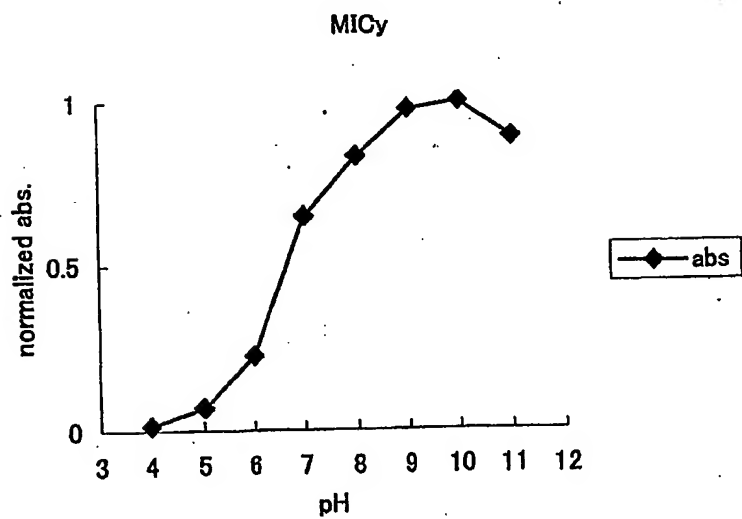
A



B



C

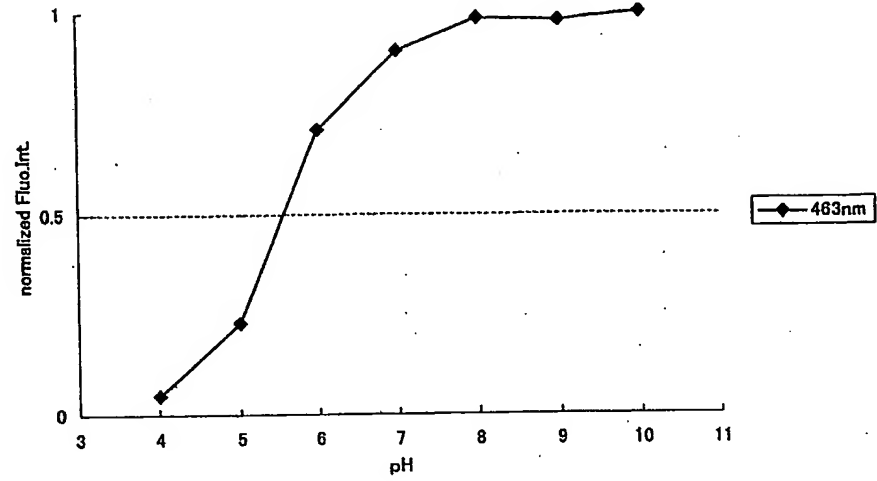


WO 2004/111235

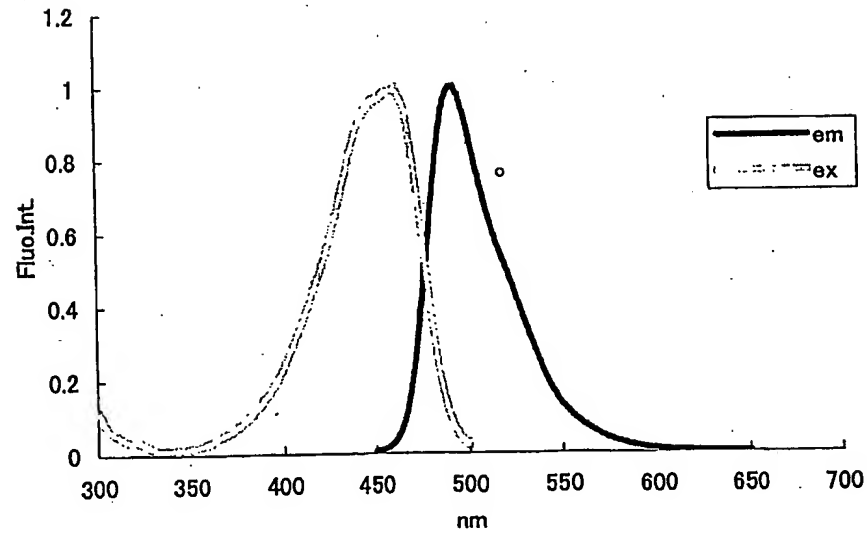
PCT/JP2004/008786

図 5

A



B

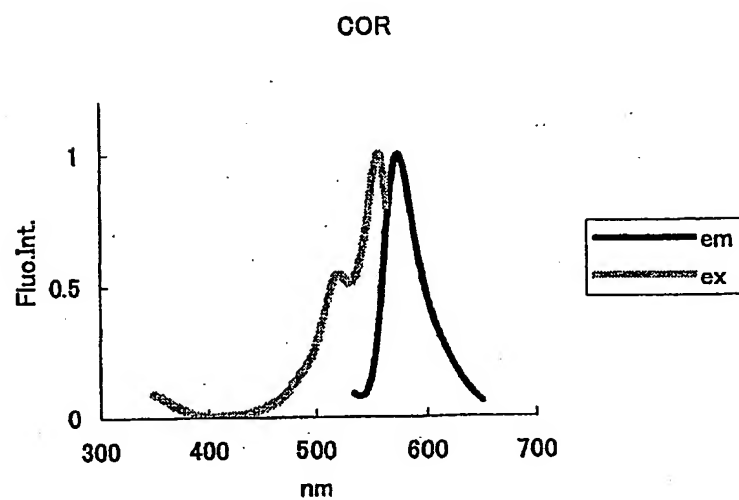


WO 2004/111235

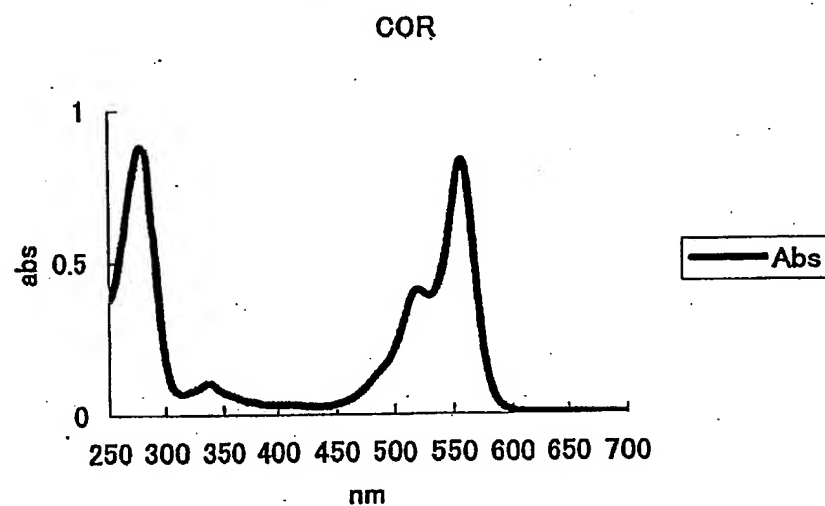
PCT/JP2004/008786

6

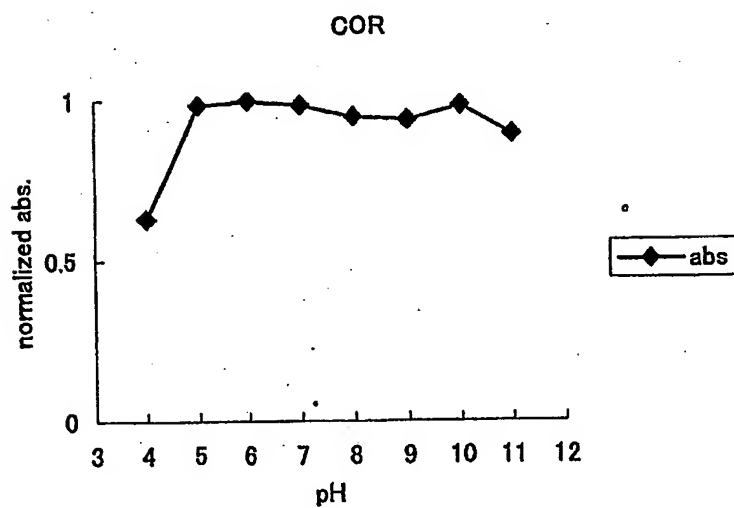
A



B



C

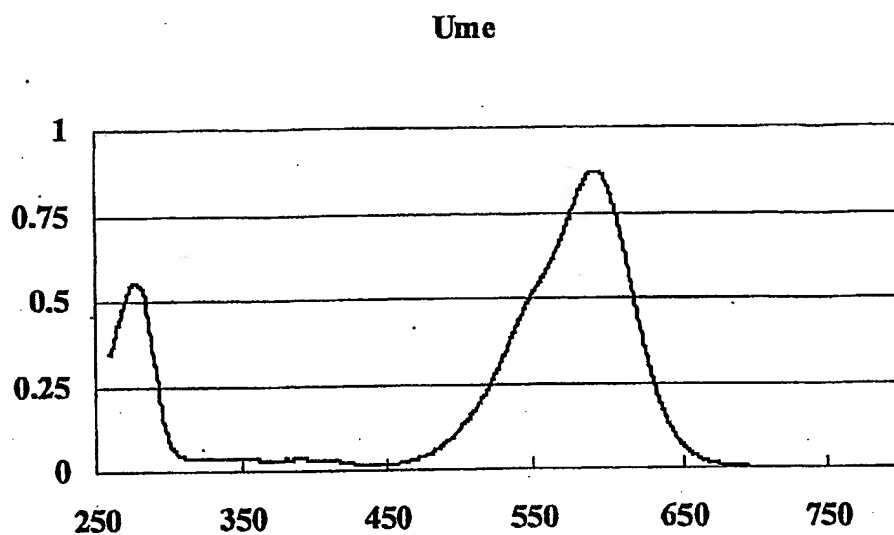


WO 2004/111235

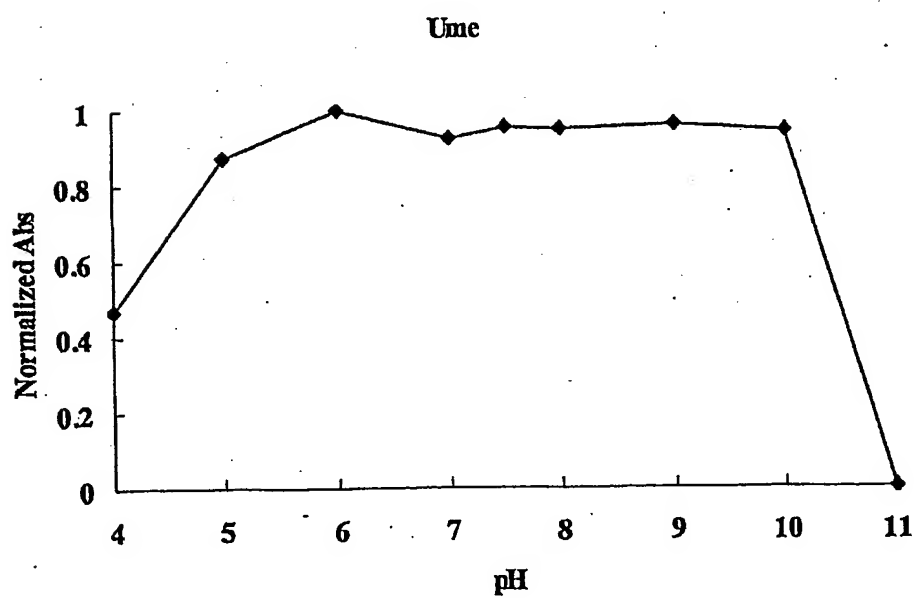
PCT/JP2004/008786

図 7

A



B

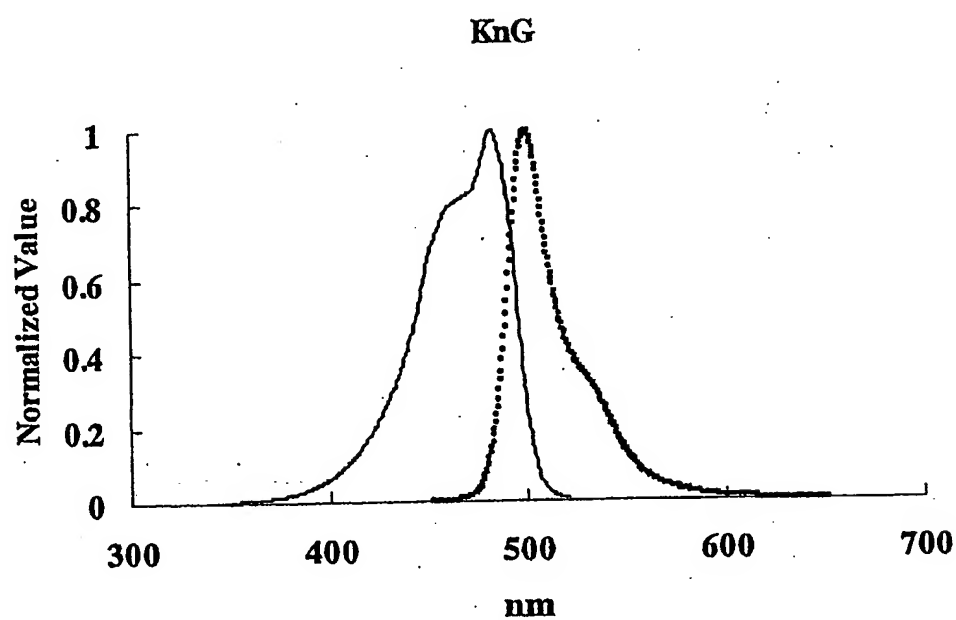


WO 2004/111235

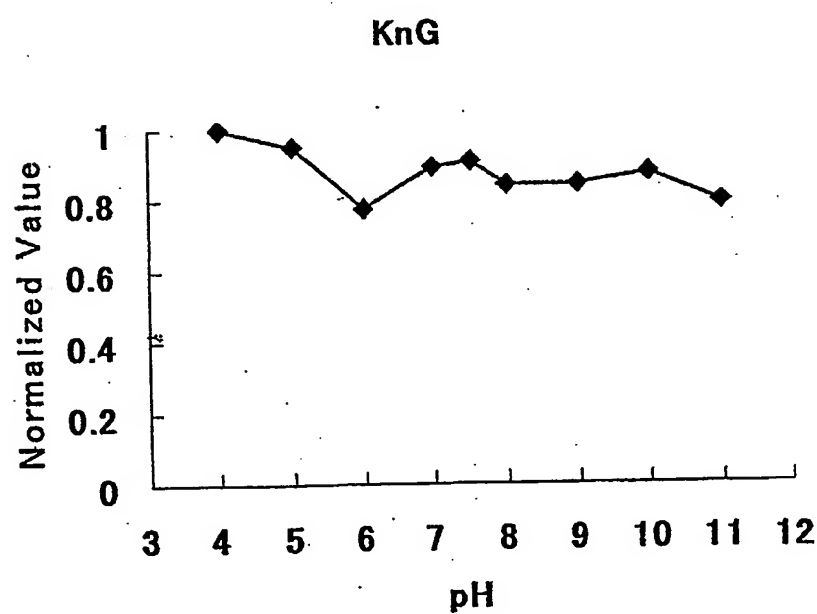
PCT/JP2004/008786

8

A



B



WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; RIKEN

&lt;120&gt; Fluorescent protein and color protein

&lt;130&gt; A41347A

&lt;160&gt; 44

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 227

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Montipora sp.

&lt;400&gt; 1

Met Ala Leu Ser Lys Arg Gly Val Lys Gly Glu Met Lys Leu Lys Phe

1 5 10 15

His Met Glu Gly Cys Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Lys Gly Glu

20 25 30

Gly Thr Gly Gln Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Cys Ile Gln Leu Arg Val

35 40 45

Glu Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ser Val Asp Ile Leu Ser Ala Ala

50 55 60

Phe Leu Tyr Gly Asn Arg Cys Met Thr Lys Tyr Pro Gly Gly Ile Val

65 70 75 80

Asp Tyr Phe Lys Asn Ser Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Ser

85 90 95

Phe Leu Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Ala Ser Ala Asp Ile Arg

100 105 110

Leu Ser Val Glu Asp Asn Cys Phe Tyr His Glu Ser Lys Phe Ser Gly

115 120 125

Val Asn Phe Pro Val Asp Gly Pro Val Met Thr Leu Ala Thr Thr Gly

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

130 135 140  
 Trp Glu Pro Ser Ser Glu Lys Met Val Pro Ser Gly Gly Ile Val Lys  
 145 150 155 160  
 Gly Asp Val Thr Met Tyr Leu Leu Leu Lys Asp Gly Gly Arg Tyr Arg  
 165 170 175  
 Cys Gln Phe Asn Ser Asn Tyr Lys Ala Lys Thr Glu Pro Lys Glu Met  
 180 185 190  
 Pro Asp Phe His Phe Val Glu His Lys Ile Val Arg Thr Asp Leu Gly  
 195 200 205  
 Gly Arg Asp Gln Lys Trp Gln Leu Val Gly Asn Ser Ala Ala Cys Ala  
 210 215 220  
 Ser Ala Phe  
 225  
 <210> 2  
 <211> 684  
 <212> DNA  
 <213> Montipora sp.  
 <400> 2  
 atg gct ctt tca aag cga ggt gtc aaa ggc gaa atg aaa ctg aaa ttc 48  
 Met Ala Leu Ser Lys Arg Gly Val Lys Gly Glu Met Lys Leu Lys Phe  
 1 5 10 15  
 cat atg gag ggg tgt gtt aac ggg cat gaa ttt aca atc aag ggc gaa 96  
 His Met Glu Gly Cys Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Lys Gly Glu  
 20 25 30  
 ggc act ggg caa cct tac gaa ggg aca cag tgt att caa ctc cgt gtg 144  
 Gly Thr Gly Gln Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Cys Ile Gln Leu Arg Val  
 35 40 45



WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

gaa aaa ggg ggt cca ttg cca ttc tca gta gac ata ttg tgc gct gcg 192  
 Glu Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ser Val Asp Ile Leu Ser Ala Ala  
 50 55 60

ttt cta tac gga aac agg tgc atg acc aaa tat cct gga ggc ata gtt 240  
 Phe Leu Tyr Gly Asn Arg Cys Met Thr Lys Tyr Pro Gly Gly Ile Val  
 65 70 75 80

gac tat ttc aag aac tca tgc cct gct gga tat aca tgg gaa agg tct 288  
 Asp Tyr Phe Lys Asn Ser Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Ser  
 85 90 95

ttt ctc ttt gaa gat ggc gcg gtg tgc aca gca agt gca gat ata cgc 336  
 Phe Leu Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Ala Ser Ala Asp Ile Arg  
 100 105 110

ttg agt gtc gag gat aac tgc ttt tat cac gaa tcc aag ttt agt gga 384  
 Leu Ser Val Glu Asp Asn Cys Phe Tyr His Glu Ser Lys Phe Ser Gly  
 115 120 125

gta aac ttt cct gtt gat gga cct gtg atg aca ctg gcg acg act ggt 432  
 Val Asn Phe Pro Val Asp Gly Pro Val Met Thr Leu Ala Thr Thr Gly  
 130 135 140

tgg gag cca tcc tcc gag aaa atg gtg ccc agt ggg ggg ata gtg aaa 480  
 Trp Glu Pro Ser Ser Glu Lys Met Val Pro Ser Gly Gly Ile Val Lys  
 145 150 155 160

ggg gat gtc acc atg tac ctc ctt ctg aag gat ggt ggg cgt tac cgg 528  
 Gly Asp Val Thr Met Tyr Leu Leu Leu Lys Asp Gly Gly Arg Tyr Arg  
 165 170 175

tgc cag ttc aac agt aat tac aag gca aag act gag ccg aaa gag atg 576  
 Cys Gln Phe Asn Ser Asn Tyr Lys Ala Lys Thr Glu Pro Lys Glu Met  
 180 185 190

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

cca gac ttt cac ttc gtg gag cat aag atc gta agg acc gac ctc ggt 624

Pro Asp Phe His Phe Val Glu His Lys Ile Val Arg Thr Asp Leu Gly

195

200

205

ggc cga gac cag aaa tgg caa ctg gtg gga aat tct gct gca tgt gca 672

Gly Arg Asp Gln Lys Trp Gln Leu Val Gly Asn Ser Ala Ala Cys Ala

210

215

220

agc gct ttc taa

684

Ser Ala Phe

225

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 232

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Acropora sp.

&lt;400&gt; 3

Met Val Ser Tyr Ser Lys Gln Gly Ile Ala Gln Glu Met Lys Thr Lys

1

5

10

15

Tyr His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly

20

25

30

Val Ala Thr Gly Tyr Pro Tyr Glu Gly Lys Gln Met Ser Glu Leu Val

35

40

45

Ile Ile Lys Pro Ala Gly Lys Pro Leu Pro Phe Ser Phe Asp Ile Leu

50

55

60

Ser Ser Val Phe His Tyr Gly Asn Arg Cys Phe Thr Lys Tyr Pro Ala

65

70

75

80

Asp Met Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Asp Gly Met Ser Tyr

85

90

95

Glu Arg Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Ala Val Ala Thr Ala Ser Trp

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

100	105	110
Asn Ile Arg Leu Glu Gly Asn Cys Phe Ile His Asn Ser Ile Phe His		
115	120	125
Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Lys Lys Gln Thr Ile		
130	135	140
Asp Trp Glu Lys Ser Phe Glu Lys Met Thr Val Ser Lys Glu Val Leu		
145	150	155
Arg Gly Asp Val Thr Met Phe Leu Met Leu Glu Gly Gly Ser His		
165	170	175
Arg Cys Gln Phe His Ser Thr Tyr Lys Thr Glu Lys Pro Val Ala Met		
180	185	190
Pro Pro Asn His Val Val Glu His Gln Ile Val Arg Thr Asp Leu Gly		
195	200	205
Gln Ser Ala Lys Gly Phe Thr Val Lys Leu Glu Ala His Ala Val Ala		
210	215	220
His Val Asn Pro Leu Lys Val Lys		

225

230

<210> 4

<211> 699

<212> DNA

<213> Acropora sp.

<400> 4

atg gtg tct tat tca aag caa ggc atc gca caa gaa atg aag acg aaa 48

Met Val Ser Tyr Ser Lys Gln Gly Ile Ala Gln Glu Met Lys Thr Lys

1

5

10

15

tac cat atg gaa ggc agt gtc aat ggc cat gaa ttc acg atc gaa ggt 96

Tyr His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

20 25 30  
gta gca act ggg tac cct tac gaa ggg aaa cag atg tcc gaa tta gtg 144  
Val Ala Thr Gly Tyr Pro Tyr Glu Gly Lys Gln Met Ser Glu Leu Val  
35 40 45  
atc atc aag cct gcg gga aaa ccc ctt cca ttc tcc ttt gac ata ctg 192  
Ile Ile Lys Pro Ala Gly Lys Pro Leu Pro Phe Ser Phe Asp Ile Leu  
50 55 60  
tca tca gtc ttt cat tat gga aac agg tgc ttc aca aag tac cct gca 240  
Ser Ser Val Phe His Tyr Gly Asn Arg Cys Phe Thr Lys Tyr Pro Ala  
65 70 75 80  
gac atg cct gac tat ttc aag caa gca ttc cca gat gga atg tcg tat 288  
Asp Met Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Asp Gly Met Ser Tyr  
85 90 95  
gaa agg tca ttt cta ttt gaa gat gga gca gtt gct aca gcc ago tgg 336  
Glu Arg Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Ala Val Ala Thr Ala Ser Trp  
100 105 110  
aac att cgt ctc gaa gga aat tgc ttc atc cac aat tcc atc ttt cat 384  
Asn Ile Arg Leu Glu Gly Asn Cys Phe Ile His Asn Ser Ile Phe His  
115 120 125  
ggc gta aac ttt ccc gct gat gga ccc gta atg aaa aag cag aca att 432  
Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Lys Lys Gln Thr Ile  
130 135 140  
gac tgg gag aag tcc ttc gaa aaa atg act gtg tct aaa gag gtg cta 480  
Asp Trp Glu Lys Ser Phe Glu Lys Met Thr Val Ser Lys Glu Val Leu  
145 150 155 160  
aga ggt gat gtg act atg ttt ctt atg ctc gaa gga ggt ggt tct cac 528  
Arg Gly Asp Val Thr Met Phe Leu Met Leu Glu Gly Gly Gly Ser His

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

165 170 175  
aga tgc cag ttt cac tcc act tac aaa aca gag aag ccg gtc gca atg 576  
Arg Cys Gln Phe His Ser Thr Tyr Lys Thr Glu Lys Pro Val Ala Met  
180 185 190  
ccc ccg aat cat gtc gta gaa cat caa att gtg agg acc gac ctt ggc 624  
Pro Pro Asn His Val Val Glu His Gln Ile Val Arg Thr Asp Leu Gly  
195 200 205  
caa agt gca aaa ggc ttt aca gtc aag ctg gaa gca cat gct gtg gct 672  
Gln Ser Ala Lys Gly Phe Thr Val Lys Leu Glu Ala His Ala Val Ala  
210 215 220  
cat gtt aac cct ttg aag gtt aaa taa 699  
His Val Asn Pro Leu Lys Val Lys  
225 230  
<210> 5  
<211> 232  
<212> PRT  
<213> Acropora sp.  
<400> 5  
Met Val Ser Tyr Ser Lys Gln Gly Ile Ala Gln Glu Met Arg Thr Lys  
1 5 10 15  
Tyr Arg Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly  
20 25 30  
Val Gly Thr Gly Asn Pro Tyr Glu Gly Lys Gln Met Ser Glu Leu Val  
35 40 45  
Ile Ile Lys Ser Lys Gly Lys Pro Leu Pro Phe Ser Phe Asp Ile Leu  
50 55 60  
Ser Thr Ala Phe Gln Tyr Gly Asn Arg Cys Phe Thr Lys Tyr Pro Ala

PCT/JP2004/008786

atg gtg tct tat tca aag caa ggc atc gca caa gaa atg cgg acg aaa 48

Met Val Ser Tyr Ser Lys Gln Gly Ile Ala Gln Glu Met Arg Thr Lys

1 5 10 15

tac cgt atg gaa ggc agt gtc aat ggc cat gaa ttc acg atc gaa ggt 96

Tyr Arg Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly

20 25 30

gta gga act gga aac cct tac gaa ggg aaa cag atg tcc gaa tta gtg 144

Val Gly Thr Gly Asn Pro Tyr Glu Gly Lys Gln Met Ser Glu Leu Val

35 40 45

atc atc aag tct aag gga aaa ccc ctt cca ttc tcc ttt gac ata ctg 192

Ile Ile Lys Ser Lys Gly Lys Pro Leu Pro Phe Ser Phe Asp Ile Leu

50 55 60

tca aca gcc ttt caa tat gga aac aga tgc ttc aca aag tac cct gca 240

Ser Thr Ala Phe Gln Tyr Gly Asn Arg Cys Phe Thr Lys Tyr Pro Ala

65 70 75 80

gac atg cct gac tat ttc aag caa gca ttc cca gat gga atg tca tat 288

Asp Met Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Asp Gly Met Ser Tyr

85 90 95

gaa agg tca ttt cta ttt gag gat gga gga gtt gct aca gcc agc tgg 336

Glu Arg Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Gly Val Ala Thr Ala Ser Trp

100 105 110

agc att cgt ctc gaa gga aat tgc ttc atc cac aat tcc atc tat cat 384

Ser Ile Arg Leu Glu Gly Asn Cys Phe Ile His Asn Ser Ile Tyr His

115 120 125

ggc gta aac ttt ccc gct gat gga ccc gta atg aag aag cag aca att 432

Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Lys Lys Gln Thr Ile

130 135 140

ggc tgg gat aag tcc ttc gaa aaa atg agt gtg gct aaa gag gtg cta 480

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

Gly Trp Asp Lys Ser Phe Glu Lys Met Ser Val Ala Lys Glu Val Leu  
145                      150                      155                      160  
aga ggt gat gtg act cag ttt ctt ctg ctc gaa gga ggt ggt tac cag 528  
Arg Gly Asp Val Thr Gln Phe Leu Leu Leu Glu Gly Gly Gly Tyr Gln  
                         165                      170                      175  
aga tgc cgg ttt cac tcc act tac aaa acg gag aag cca gtc gca atg 576  
Arg Cys Arg Phe His Ser Thr Tyr Lys Thr Glu Lys Pro Val Ala Met  
                         180                      185                      190  
ccc ccg agt cat gtc gta gaa cat caa att gtg agg acc gac ctt ggc 624  
Pro Pro Ser His Val Val Glu His Gln Ile Val Arg Thr Asp Leu Gly  
                         195                      200                      205  
caa act gca aaa ggc ttc aag gtc aag ctg gaa gaa cat gct gag gct 672  
Gln Thr Ala Lys Gly Phe Lys Val Lys Leu Glu Glu His Ala Glu Ala  
                         210                      215                      220  
cat gtt aac cct ttg aag gtt aaa taa                      699  
His Val Asn Pro Leu Lys Val Lys  
225                      230  
<210> 7  
<211> 232  
<212> PRT  
<213> Acropora sp.  
<400> 7  
Met Val Ser Tyr Ser Lys Gln Gly Ile Ala Gln Glu Met Arg Thr Lys  
1                      5                      10                      15  
Tyr Arg Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly  
                         20                      25                      30  
Val Gly Thr Gly Asn Pro Tyr Glu Gly Lys Gln Met Ser Glu Leu Val



WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

35 40 45  
Ile Ile Lys Ser Lys Gly Lys Pro Leu Pro Phe Ser Phe Asp Ile Leu  
50 55 60  
Ser Thr Ala Phe Gln Tyr Gly Asn Arg Cys Phe Thr Lys Tyr Pro Ala  
65 70 75 80  
Asp Met Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Asp Gly Met Ser Tyr  
85 90 95  
Glu Arg Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Gly Val Ala Thr Ala Ser Trp  
100 105 110  
Ser Ile Arg Leu Glu Gly Asn Cys Phe Ile His Asn Ser Ile Tyr His  
115 120 125  
Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Lys Lys Gln Thr Ile  
130 135 140  
Gly Trp Asp Lys Ser Phe Glu Lys Met Ser Val Ala Lys Glu Val Leu  
145 150 155 160  
Arg Gly Asp Val Thr His Phe Leu Leu Leu Glu Gly Gly Tyr Gln  
165 170 175  
Arg Cys Arg Phe His Ser Thr Tyr Lys Thr Glu Lys Pro Val Ala Met  
180 185 190  
Pro Pro Ser His Val Val Glu His Gln Ile Val Arg Thr Asp Leu Gly  
195 200 205  
Gln Thr Ala Lys Gly Phe Lys Val Lys Leu Glu Glu His Ala Glu Ala  
210 215 220  
His Val Asn Pro Leu Lys Val Lys  
225 230  
<210> 8  
<211> 699

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Acropora sp.

&lt;400&gt; 8

atg gtg tct tat tca aag caa ggc atc gca caa gaa atg cgg acg aaa 48

Met Val Ser Tyr Ser Lys Gln Gly Ile Ala Gln Glu Met Arg Thr Lys

1

5

10

15

tac cgt atg gaa ggc agt gtc aat ggc cat gaa ttc acg atc gaa ggt 96

Tyr Arg Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Thr Ile Glu Gly

20

25

30

gta gga act gga aac cct tac gaa ggg aaa cag atg tcc gaa tta gtg 144

Val Gly Thr Gly Asn Pro Tyr Glu Gly Lys Gln Met Ser Glu Leu Val

35

40

45

atc atc aag tct aag gga aaa ccc ctt cca ttc tcc ttt gac ata ctg 192

Ile Ile Lys Ser Lys Gly Lys Pro Leu Pro Phe Ser Phe Asp Ile Leu

50

55

60

tca aca gcc ttt caa tat gga aac aga tgc ttc aca aag tac cct gca 240

Ser Thr Ala Phe Gln Tyr Gly Asn Arg Cys Phe Thr Lys Tyr Pro Ala

65

70

75

80

gac atg cct gac tat ttc aag caa gca ttc cca gat gga atg tca tat 288

Asp Met Pro Asp Tyr Phe Lys Gln Ala Phe Pro Asp Gly Met Ser Tyr

85

90

95

gaa agg tca ttt cta ttt gag gat gga gga gtt gct aca gcc agc tgg 336

Glu Arg Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Gly Val Ala Thr Ala Ser Trp

100

105

110

agc att cgt ctc gaa gga aat tgc ttc atc cac aat tcc atc tat cat 384

Ser Ile Arg Leu Glu Gly Asn Cys Phe Ile His Asn Ser Ile Tyr His

115

120

125

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

ggc gta aac ttt ccc gct gat gga ccc gta atg aag aag cag aca att 432

Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Lys Lys Gln Thr Ile

130

135

140

ggc tgg gat aag tcc ttc gaa aaa atg agt gtg gct aaa gag gtg cta 480

Gly Trp Asp Lys Ser Phe Glu Lys Met Ser Val Ala Lys Glu Val Leu

145

150

155

160

aga ggt gat gtg act cat ttt ctt ctg ctc gaa gga ggt ggt tac cag 528

Arg Gly Asp Val Thr His Phe Leu Leu Leu Glu Gly Gly Tyr Gln

165

170

175

aga tgc cgg ttt cac tcc act tac aaa acg gag aag cca gtc gca atg 576

Arg Cys Arg Phe His Ser Thr Tyr Lys Thr Glu Lys Pro Val Ala Met

180

185

190

ccc ccg agt cat gtc gta gaa cat caa att gtg agg acc gac ctt ggc 624

Pro Pro Ser His Val Val Glu His Gln Ile Val Arg Thr Asp Leu Gly

195

200

205

caa act gca aaa ggc ttc aag gtc aag ctg gaa gaa cat gct gag gct 672

Gln Thr Ala Lys Gly Phe Lys Val Lys Leu Glu Glu His Ala Glu Ala

210

215

220

cat gtt aac cct ttg aag gtt aaa taa

699

His Val Asn Pro Leu Lys Val Lys

225

230

<210> 9

<211> 232

<212> PRT

<213> *Montipora sp.*

<400> 9

Met Ala Leu Ser Lys His Gly Leu Thr Lys Asn Met Thr Thr Lys Tyr

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

1 5 10 15  
Arg Met Glu Gly Cys Val Asp Gly His Lys Phe Val Ile Thr Gly Asp  
20 25 30  
Gly Ile Gly Asp Pro Phe Glu Gly Lys Gln Thr Ser Ile Asp Leu Cys  
35 40 45  
Val Val Glu Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ser Glu Asp Ile Leu Ser Ala  
50 55 60  
Val Phe Asp Tyr Gly Asn Arg Val Phe Thr Lys Tyr Pro Gln Asp Leu  
65 70 75 80  
Val Asp Tyr Phe Lys Asn Ser Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Trp Gln Arg  
85 90 95  
Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Ala Ser Ala Asp Ile  
100 105 110  
Arg Val Ser Val Glu Glu Asn Cys Phe Tyr His Glu Ser Lys Phe His  
115 120 125  
Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Lys Lys Met Thr Thr  
130 135 140  
Asn Trp Glu Pro Ser Cys Glu Lys Ile Thr Pro Ile Leu Asn Glu Gly  
145 150 155 160  
Ile Leu Lys Gly Asp Val Thr Met Phe Leu Leu Leu Lys Asp Gly Gly  
165 170 175  
Arg Tyr Arg Cys Gln Phe Asp Thr Val Tyr Lys Ala Lys Ala Asp Ala  
180 185 190  
Lys Lys Met Pro Glu Trp His Phe Ile Gln His Lys Leu Thr Arg Glu  
195 200 205  
Asp Arg Ser Asp Ala Lys His Gln Lys Trp Arg Leu Val Glu Asn Ala  
210 215 220

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

Ile Ala Tyr Arg Ser Thr Leu Pro

225

230

<210> 10

<211> 699

<212> DNA

<213> *Montipora sp.*

<400> 10

atg gct ctt tca aag cac ggt cta aca aag aac atg acg acg aaa tac 48

Met Ala Leu Ser Lys His Gly Leu Thr Lys Asn Met Thr Thr Lys Tyr

1

5

10

15

cgc atg gaa ggg tgt gtc gat ggg cat aaa ttt gta atc acg ggc gac 96

Arg Met Glu Gly Cys Val Asp Gly His Lys Phe Val Ile Thr Gly Asp

20

25

30

ggc att gga gat cct ttc gaa ggg aaa cag act agt att gat ctg tgt 144

Gly Ile Gly Asp Pro Phe Glu Gly Lys Gln Thr Ser Ile Asp Leu Cys

35

40

45

gtg gtt gaa ggg gga cca ctg cca ttc tcc gaa gat ata ttg tct gct 192

Val Val Glu Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ser Glu Asp Ile Leu Ser Ala

50

55

60

gtg ttt gac tac gga aac agg gtc ttt act aaa tat cct caa gac ctt 240

Val Phe Asp Tyr Gly Asn Arg Val Phe Thr Lys Tyr Pro Gln Asp Leu

65

70

75

80

gtt gac tat ttc aag aac tca tgt cct gct gga tat aca tgg caa agg 288

Val Asp Tyr Phe Lys Asn Ser Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Trp Gln Arg

85

90

95

tct ttt ctc ttt gaa gat ggt gca gtt tgc aca gcc agt gca gat ata 336

Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Ala Ser Ala Asp Ile

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

100 105 110  
aga gtg agt gtt gag gag aac tgc ttt tat cac gag tcc aag ttt cat. 384  
Arg Val Ser Val Glu Glu Asn Cys Phe Tyr His Glu Ser Lys Phe His  
115 120 125  
gga gtg aac ttt cct gct gat gga cct gtg atg aaa aag atg aca act 432  
Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Lys Lys Met Thr Thr  
130 135 140  
aat tgg gaa cca tcc tgc gag aaa atc aca cca ata ctt aat gag ggg 480  
Asn Trp Glu Pro Ser Cys Glu Lys Ile Thr Pro Ile Leu Asn Glu Gly  
145 150 155 160  
ata ttg aaa gga gat gtc acc atg ttc ctc ctt ctg aag gat ggt ggg 528  
Ile Leu Lys Gly Asp Val Thr Met Phe Leu Leu Leu Lys Asp Gly Gly  
165 170 175  
cgt tac cgg tgc cag ttc gac aca gtt tac aaa gca aag gct gac gca 576  
Arg Tyr Arg Cys Gln Phe Asp Thr Val Tyr Lys Ala Lys Ala Asp Ala  
180 185 190  
aaa aag atg ccg gaa tgg cac ttc atc caa cat aag ctc acc cgg gaa 624  
Lys Lys Met Pro Glu Trp His Phe Ile Gln His Lys Leu Thr Arg Glu  
195 200 205  
gac cgc agc gat gct aag cac cag aaa tgg cga ctg gta gaa aat gct 672  
Asp Arg Ser Asp Ala Lys His Gln Lys Trp Arg Leu Val Glu Asn Ala  
210 215 220  
att gca tac cga tcc aca tta ccc tga 699  
Ile Ala Tyr Arg Ser Thr Leu Pro  
225 230  
<210> 11  
<211> 232

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Actinia equina

&lt;400&gt; 11

Met Ser Ser Leu Val Lys Lys Asp Met Cys Ile Lys Met Thr Met Glu

1 5 10 15

Gly Thr Val Asn Gly His His Phe Lys Cys Val Gly Glu Gly Glu Gly

20 25 30

Lys Pro Phe Glu Gly Thr Gln Glu Glu Lys Ile Arg Ile Thr Glu Gly

35 40 45

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Ala Pro Cys Cys Met Tyr

50 55 60

Gly Ser Lys Thr Phe Ile Lys His Val Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Phe

65 70 75 80

Lys Asp Ser Leu Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Gln Ile Tyr

85 90 95

Glu Asp Gly Gly Tyr Leu Thr Ile His Gln Asp Thr Ser Ile Gln Gly

100 105 110

Asp Ser Phe Ile Phe Lys Val Lys Val Ile Gly Ala Asn Phe Pro Ala

115 120 125

Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Ala Gly Trp Glu Pro Cys Val

130 135 140

Glu Met Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Cys Gly Gln Ser Leu Met

145 150 155 160

Ala Leu Lys Cys Thr Asp Gly Asn His Leu Thr Ser His Leu Arg Thr

165 170 175

Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Pro Ala Asn Ala Val Asn Met Pro Lys Phe

180 185 190

17/31

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

His Phe Gly Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Lys Glu Ala Glu Pro Gly

195

200

205

Lys Phe Tyr Glu Gln Tyr Glu Ser Ala Val Ala Arg Tyr Cys Glu Ala

210

215

220

Ala Pro Ser Lys Leu Gly His His

225

230

<210> 12

<211> 699

<212> DNA

<213> Actinia equina

<400> 12

atg tct tca ttg gtt aag aag gat atg tgc atc aag atg acc atg gaa 48

Met Ser Ser Leu Val Lys Lys Asp Met Cys Ile Lys Met Thr Met Glu

1

5

10

15

ggg aca gta aat ggt cac cac ttc aag tgt gta gga gaa gga gaa ggc 96

Gly Thr Val Asn Gly His His Phe Lys Cys Val Gly Glu Gly Glu Gly

20

25

30

aag cca ttt gaa ggt acc cag gag gaa aag ata aga atc act gaa gga 144

Lys Pro Phe Glu Gly Thr Gln Glu Glu Lys Ile Arg Ile Thr Glu Gly

35

40

45

ggt ccc tta cca ttt gcg tac gat att ttg gca cct tgt tgc atg tat 192

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Ala Pro Cys Cys Met Tyr

50

55

60

gga agc aaa acc ttc atc aag cat gtc tca ggg att cca gat tac ttc 240

Gly Ser Lys Thr Phe Ile Lys His Val Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Phe

65

70

75

80

aag gat tct tta cct gaa gga tac act tgg gaa aga acc caa atc tac 288



WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

Lys Asp Ser Leu Pro Glu Gly Tyr Thr Trp Glu Arg Thr Gln Ile Tyr

85

90

95

gag gat gga ggc tat ctt acc att cac cag gac aca agc ata cag gga 336

Glu Asp Gly Gly Tyr Leu Thr Ile His Gln Asp Thr Ser Ile Gln Gly

100

105

110

gat agc ttt att ttc aag gtt aaa gtc atc ggt gcc aac ttc cct gcc 384

Asp Ser Phe Ile Phe Lys Val Lys Val Ile Gly Ala Asn Phe Pro Ala

115

120

125

aat ggt ccc gtg atg cag aag aaa aca gcc gga tgg gaa cca tgc gta 432

Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Ala Gly Trp Glu Pro Cys Val

130

135

140

gag atg ctt tat cca cgt gac gga gtc ctg tgt ggg cag tcc ttg atg 480

Glu Met Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Cys Gly Gln Ser Leu Met

145

150

155

160

gcc ctg aaa tgc act gat ggt aac cat ttg acg agc cat ctg cga act 528

Ala Leu Lys Cys Thr Asp Gly Asn His Leu Thr Ser His Leu Arg Thr

165

170

175

act tac agg tcc aga aag cca gcc aat gcg gtt aat atg cca aaa ttt 576

Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Pro Ala Asn Ala Val Asn Met Pro Lys Phe

180

185

190

cat ttt gga gac cat cgc att gag ata cta aag gaa gca gaa cca ggc 624

His Phe Gly Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Lys Glu Ala Glu Pro Gly

195

200

205

aag ttt tat gaa cag tac gaa tca gca gtg gcc agg tac tgt gaa gct 672

Lys Phe Tyr Glu Gln Tyr Glu Ser Ala Val Ala Arg Tyr Cys Glu Ala

210

215

220

gca cca tca aag ctt gga cat cac taa

699

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

Ala Pro Ser Lys Leu Gly His His

225 230

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 224

&lt;212&gt; PRT

<213> *Lobophytum crassum*

&lt;400&gt; 13

Met Ser Val Ile Lys Gln Glu Met Lys Ile Lys Leu His Met Glu Gly

1 5 10 15

Asn Val Asn Gly His Ala Phe Val Ile Glu Gly Asp Gly Lys Gly Lys

20 25 30

Pro Tyr Asp Gly Thr Gln Thr Leu Asn Leu Thr Val Lys Glu Gly Ala

35 40 45

Pro Leu Pro Phe Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Asn Ala Phe Gln Tyr Gly

50 55 60

Asn Arg Ala Phe Thr Lys Tyr Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Phe Lys

65 70 75 80

Gln Thr Phe Pro Glu Gly Tyr Ser Trp Glu Arg Thr Met Ser Tyr Glu

85 90 95

Asp Asn Ala Ile Cys Asn Val Arg Ser Glu Ile Ser Met Glu Gly Asp

100 105 110

Cys Phe Ile Tyr Lys Ile Arg Phe Asp Gly Lys Asn Phe Pro Pro Asn

115 120 125

Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Lys Trp Glu Pro Ser Thr Glu

130 135 140

Met Met Tyr Val Arg Asp Gly Phe Leu Met Gly Asp Val Asn Met Ala

145 150 155 160

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

Leu Leu Leu Glu Gly Gly Gly His His Arg Cys Asp Phe Lys Thr Ser

165

170

175

Tyr Lys Ala Lys Lys Val Val Gln Leu Pro Asp Tyr His Tyr Val Asp

180

185

190

His Arg Ile Glu Ile Leu Ser His Asp Arg Asp Tyr Ser Lys Val Lys

195

200

205

Leu Tyr Glu Asn Ala Val Ala Arg Tyr Ser Leu Leu Pro Ser Gln Ala

210

215

220

<210> 14

<211> 675

<212> DNA

<213> *Lobophytum crassum*

<400> 14

atg agt gtg att aaa caa gaa atg aag atc aag ctg cat atg gaa gga 48

Met Ser Val Ile Lys Gln Glu Met Lys Ile Lys Leu His Met Glu Gly

1

5

10

15

aat gta aac ggt cat gca ttt gtg att gaa gga gat gga aaa gga aag 96

Asn Val Asn Gly His Ala Phe Val Ile Glu Gly Asp Gly Lys Gly Lys

20

25

30

cct tac gat ggg aca cag act tta aac ctg aca gtg aaa gaa ggc gca 144

Pro Tyr Asp Gly Thr Gln Thr Leu Asn Leu Thr Val Lys Glu Gly Ala

35

40

45

cct ctc cct ttt tct tac gac atc ttg aca aat gcg ttc cag tac gga 192

Pro Leu Pro Phe Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Asn Ala Phe Gln Tyr Gly

50

55

60

aat aga gca ttc act aaa tat cca gcc gat ata cca gac tat ttc aag 240

Asn Arg Ala Phe Thr Lys Tyr Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Phe Lys

PCT/JP2004/008786

22/31

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

210

215

220

tag

675

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 15

gaaggrtgyg tcaayggrca y

21

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 16

acvggdcat ydgaagaaa rtt

23

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 17

ggccacgcgt cgactagtagt gggiigggi gggiig

36

&lt;210&gt; 18

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 18

ccatcttcaa agagaaaaga cttt

25

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 19

ggccacggt cgactagtc

20

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 20

catgagttct tgaaatagtc aac

23

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 21

atggctcttt caaagcgagg tg

22

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 22

gggggatccg accatggctc tttcaaagcg aggtg

35

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 23

tagaaatgac ctttcatatg acattc

26

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 24

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

tctgtttcca tattgaaagg ctg

23

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 25

atggtgtctt attcaaagca aggcacgcga ca

32

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 26

cgggatccga ccatggtgtc ttattcaaag caaggcatcg caca

44

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 27

tagaaatgac ctttcatatg acattc

26

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 23



WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 28

tctgtttcca tattgaaagg ctg 23

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 29

atggtgtctt attcaaagca aggcacgca ca 32

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 30

cgggatccga ccatggtgtc ttattcaaag caaggcatcg caca 44

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 31

atggctcttt caaagcacgg tc

22

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 32

gggggatccg accatggctc tttcaaagca cggtc

35

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 33

ggiwsbgia ayggvcayda ntt

23

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 34

gtcittcttyt gcaciagcgg iccatydgva ggaaa

35

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 35

ccttgaaaat aaagctatct 20

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 36

ccctgtatgc ttgtgtcctg 20

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 37

cccgatccg accatggtgt cttcattggt taagaa 36

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 38

grraggiwsb gthaayggvc a

21

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 39

aactggaaga attcgcgcc gcaggaa

27

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 40

gtcittcttyt gcaciacigg iccatydgva ggaaa

35

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

WO 2004/111235

PCT/JP2004/008786

&lt;400&gt; 41

ttgtcaagat atcgaaagcg aacggcagag

30

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 42

ggccacgcgt cgactagtac

20

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 43

cttctcacgt tgcaaatggc

20

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 44

cccggatcgg atgagtgtga ttacawcaga aatgaagatg gagc

44

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008786

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/435, C07K19/00, C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/533

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/435, C07K19/00, C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/533

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/042401 A2 (Clontech Laboratories Inc.), 22 May, 2003 (22.05.03), (Family: none)	1, 7, 13-15, 26-30, 32, 34, 35.
X	WO 01/027150 A2 (Clontech Laboratories Inc.), 19 April, 2001 (19.04.01), & EP 1305412 A2 & JP 2003-527833 A	1, 6, 7, 12-15, 24-30, 32, 34, 35
X	WO 02/068459 A2 (Clontech Laboratories Inc.), 06 September, 2002 (06.09.02), & EP 1385967 A2 & US 2002/0197676 A1 & US 2003/0022287 A1	1-4, 7-10, 13-21, 26-30, 32, 34, 35

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 July, 2004 (12.07.04)Date of mailing of the international search report  
03 August, 2004 (03.08.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008786

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/34318 A1 (Clontech Laboratories Inc.), 15 June, 2000 (15.06.00), (Family: none)	1, 4, 7, 10, 13-15, 20, 21, 26-30, 32, 34, 35
X	JP 2002-531146 A (Clontech Laboratories Inc.), 24 September, 2002 (24.09.02), & WO 2000/34526 A1 & EP 1135532 A1	2-5, 8-11, 13, 16-23, 26-35
X	WO 00/34320 A1 (Clontech Laboratories Inc.), 15 June, 2000 (15.06.00), (Family: none)	2, 3, 8, 9, 13, 16-19, 26-30, 32, 34, 35
X	WO 02/090535 A1 (Rigel Pharmaceuticals Inc.), 14 November, 2002 (14.11.02), & EP 1399547 A1 & US 2003/0149254 A1 & US 2004/0002056 A1	4, 6, 10, 12, 13, 20, 21, 24-30, 32, 34, 35
X	WO 00/34319 A1 (Clontech Laboratories Inc.), 15 June, 2000 (15.06.00), (Family: none)	5, 11, 13, 22, 23, 26-35
X	WO 02/096924 A1 (Clontech Laboratories Inc.), 05 December, 2002 (05.12.02), (Family: none)	5, 11, 13, 22, 23, 26-35
X	WO 03/033693 A1 (The Institute of Physical and Chemical Research), 24 April, 2003 (24.04.03), (Family: none)	6, 12, 13, 24-30, 32, 34, 35
X	WO 00/34321 A1 (Clontech Laboratories Inc.), 15 June, 2000 (15.06.00), (Family: none)	6, 12, 13, 24-30, 32, 34, 35

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008786

**Box No. II** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III** Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

With respect to the fluorescent proteins defined by SEQ ID Nos. 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 set forth in the claims, although the fluorescent proteins derived from *Acropora* sp. and defined by SEQ ID Nos. 3, 5 and 7 have analogous amino acid sequences (88% or higher identity), there is no common chemical structure (65% or below identity) among the other amino acid sequences, which are only common to each other in being fluorescent proteins derived from the anthozoan class.

However, since various fluorescent proteins derived from the anthozoan class (*Sinularia lochmodes* subclass and *Scleractinians* subclass) are known as (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008786

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

described in the references cited in the following C-column, being fluorescent proteins derived from the anthozoan class cannot constitute special technical features within the meaning of PCT Rule 13.2.

Therefore, the inventions relating to fluorescent proteins defined by SEQ ID Nos. 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 among the inventions claimed in the claims cannot be stated as being a group of inventions linked with each other so as to form a single general inventive concept. It appears that as the fluorescent proteins defined by SEQ ID Nos. 3, 5 and 7 satisfy the requirement of unity of invention, the inventions consist of a group of five inventions directed to five different fluorescent proteins.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/008786

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/435, C07K19/00, C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/533

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/435, C07K19/00, C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/533

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/Geneseq,  
WPI(DIALOG)、BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 03/042401 A2 (Clontech Laboratories Inc) 2003. 05. 22 (ファミリーなし)	1, 7, 13-15, 26 -30, 32, 34, 35
X	WO 01/027150 A2 (Clontech Laboratories Inc) 2001. 04. 19 & EP 1305412 A2 & JP 2003-527833 A	1, 6, 7, 12-15, 24-30, 32, 34, 35
X	WO 02/068459 A2 (Clontech Laboratories Inc) 2002. 09. 06 & EP 1385967 A2 & US 2002/0197676 A1 & US 2003/0022287 A1	1-4, 7-10, 13- 21, 26-30, 32, 34, 35

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 07. 2004

国際調査報告の発送日

03. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4 N

8 4 1 2

電話番号 03-3581-1101, 内線 3448

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/008786

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/34318 A1 (Clontech Laboratories Inc) 2000.06.15 (ファミリーなし)	1, 4, 7, 10, 13- 15, 20, 21, 26- 30, 32, 34, 35
X	JP 2002-531146 A (Clontech Laboratories Inc) 2002.09.24 & WO 2000/34526 A1 & EP 1135532 A1	2-5, 8-11, 13, 16-23, 26-35
X	WO 00/34320 A1 (Clontech Laboratories Inc) 2000.06.15 (ファミリーなし)	2, 3, 8, 9, 13, 16-19, 26-30, 32, 34, 35
X	WO 02/090535 A1 (Rigel Pharmaceuticals Inc) 2002.11.14 & EP 1399547 A1 & US 2003/0149254 A1 & US 2004/0002056 A1	4, 6, 10, 12, 13, 20, 21, 24- 30, 32, 34, 35
X	WO 00/34319 A1 (Clontech Laboratories Inc) 2000.06.15 (ファミリーなし)	5, 11, 13, 22, 23, 26-35
X	WO 02/096924 A1 (Clontech Laboratories Inc) 2002.12.05 (ファミリーなし)	5, 11, 13, 22, 23, 26-35
X	WO 03/033693 A1 (理化学研究所) 2003.04.24 (ファミリーなし)	6, 12, 13, 24- 30, 32, 34, 35
X	WO 00/34321 A1 (Clontech Laboratories Inc) 2000.06.15 (ファミリーなし)	6, 12, 13, 24- 30, 32, 34, 35

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/008786

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲に記載された配列番号1、3、5、7、9、11、13で表される蛍光蛋白質は、配列番号3、5、7で表されるミドリイシ由来の蛍光蛋白質が類似するアミノ酸配列(同一性88%以上)を有するものの、その他のアミノ酸配列の間には共通の化学構造は存在せず(同一性65%以下)、花虫綱由来の蛍光蛋白質であることにおいてのみ共通する。

しかしながら、下記C欄の引用文献にも記載されているように、花虫綱(八放サンゴ亜綱、六放サンゴ亜綱)由来の蛍光蛋白質が各種知られていることから、花虫綱由来の蛍光蛋白質であることはPCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとはいえない。

よって、請求の範囲に記載された発明のうち配列番号1、3、5、7、9、11、13で表される蛍光蛋白質に関する発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、配列番号3、5、7で表される蛍光蛋白質が発明の単一性を満たすものの、異なった5種の蛍光蛋白質に関する5個の発明からなる発明群であると認められる。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**